

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
FAKULTA TEXTILNÍ



DIPLOMOVÁ PRÁCE

LIBEREC 2007

JIŘÍ CHVOJKA

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

FAKULTA TEXTILNÍ

KATEDRA NETKANÝCH TEXTILIÍ

Obor: M3106 - Textilní inženýrství

Zaměření: Netkané textilie

Vliv rozpouštědla na elektrostatické zvlákňování kopolymeru PLGA

Effect of solvent on electrospinnability of copolymer PLGA

Autor:	Jiří Chvojka
Vedoucí diplomové práce:	Ing. Lenka Martinová, CSc.
Konzultant:	Ing. Lenka Martinová, CSc.

Rozsah práce : 59

Počet stran textu : 55

Počet obrázků : 25

Počet tabulek : 5

Zadání dipl. práce od univerzity.

Prohlášení

Prohlašuji, že předložená diplomová práce je původní a zpracoval jsem ji samostatně. Prohlašuji, že citace použitých pramenů je úplná, že jsem v práci neporušil autorská práva (ve smyslu zákona č. 121/2000 Sb. O právu autorském a o právech souvisejících s právem autorským).

Souhlasím s umístěním diplomové práce v Univerzitní knihovně TUL.

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 (školní dílo).

Beru na vědomí, že TUL má právo na uzavření licenční smlouvy o užití mé diplomové práce a prohlašuji, že s o u h l a s í m s případným užitím mé diplomové práce (prodej, zapůjčení apod.).

Jsem si vědom toho, že užít své diplomové práce či poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem TUL, která má právo ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, vynaložených univerzitou na vytvoření díla (až do jejich skutečné výše).

Beru na vědomí, že si svou diplomovou práci mohu vyzvednout v Univerzitní knihovně TUL po uplynutí pěti let po obhajobě.

V Liberci, dne

Podpis

Poděkování:

Chtěl bych tímto poděkovat Ing. Lence Martinové, CSc. za odborné vedení a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Filipu Sanetrníkovi za rady při přípravě vzorků. Dále bych chtěl poděkovat rodině za velkou podporu při studiu.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá vlivem rozpouštědel na proces elektrostatického zvlákňování. V teoretické části práce byl zhodnocen současný stav vývoje elektrostatického zvlákňování polymerů. Dále zde také byly zmíněny biodegradabilní a biokompatibilní materiály, použité polymery PLA, PGA a kopolymer PLGA. V experimentální části práce byla definována zařízení, použitá rozpouštědla, vlivy rozpouštědel na proces zvlákňování, průměr vláken a vliv geometrie válečku na samotný proces elektrostatického zvlákňování.

ANOTTATION

This thesis described an effect of solvent on electrospinnability of kopolymer PLGA. In teoretical part it was described electrostatical spinning of polymers. After that it focused on biocompatibility and biodegradability of polymer materials and used polymers PLA, PGA and copolymer PLGA. In experimental part equipments, used solvent and effect of this solvent on electrospinnability were defined. At the end it was discussed about diameter of fibers and effect of geomety on elektrospinnability.

Seznam použitých zkratk

PLA	kyselina polymléčná
PGA	kyselina polyglykolová
PLGA	kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové
°C	stupeň celsia
ppm	jedna miliontina celku
LDLo	nejmenší smrtící dávka
PEO	polyethylenoxid
DMF	dimethylformamid
kV	kilovolt
CHCl ₃	chloroform
TEAB	tetraethylamoniumbromid
$\delta(\text{J/ml})^{1/2}$	parametr rozpustnosti
$\delta^2(\text{J/ml})$	Hildebrantův parametr rozpustnosti
SEM	rastrovací elektronový mikroskop
$\gamma[\text{N.m}^{-1}]$	Povrchové napětí kapaliny

Obsah:

1. Úvod	9
2. Teoretická část	10
2.1 Elektrostatické zvlákňování	10
2.1.1 Historie elektrostatického zvlákňování	10
2.1.2 Princip elektrostatického zvlákňování	10
2.1.3 Nanospider	12
2.2 PLA - kyselina polymléčná	12
2.3 PGA - kyselina polyglykolová	13
2.4 PLA-PGA - kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové	155
2.5 Biodegradabilita, biokompatibilita, sterilizace	16
2.5.1 Biodegradabilita	16
2.5.2 Biokompatibilita	17
2.5.3 Sterilizace	19
2.6 Rozpouštědla	20
2.6.1 Chloroform	21
2.6.2 Aceton	23
2.6.3 Dichlorethan	23
2.7 Vliv rozpouštědel na elektrostatické zvlákňování	24
3. Experimentální část	28
3.1 Popis rozpouštědel	28
3.1.1 Chloroform	28
3.1.2 Aceton	28
3.1.3 Dichlorethan	29
3.1.4 Dichlormethan	29
3.1.5 Ethylacetát	29
3.2 Popis použitého polymeru	29
3.3 Popis použitých koncentrací	30
3.3.1 Příprava roztoků	30
3.4 Vliv rozpouštědel na electrospinning	30
3.4.1 Dichlormethan	30
3.4.2 Směs dichlorethanu a octanu ethylnatého	31
3.4.3 Směs chloroformu a acetonu	31
3.4.4 Směs chloroformu a dichlormethanu	33
3.5 Popis zařízení, na kterém proběhlo zvlákňování	34
3.5.1 Popis zvlákňovacího zařízení	34
3.5.2 Charakteristika válečků	37
3.6 Modifikace procesu zvlákňování	42
3.6.1 Úprava vodivosti	42
3.6.2 Ovlivnění elektrického pole	42
3.6.3 Hildebrantův parametr	44
3.7 Vliv koncentrace rozpouštědel na průměr vláken	48
3.8 Vliv geometrie válečku na průměr vláken	51
3.9 Tenzometr KRÜSS K12	54
4. Závěr	57
5. Použité materiály	58

1. Úvod

V dnešní době moderních technologií se stále více uplatňují nové materiály, které vynikají svými novými a unikátními vlastnostmi. Podobně je tomu i v medicíně, kde se stále hledají nové biokompatibilní a biodegradabilní materiály, které nacházejí široké uplatnění jako náhrady tkání, kostí, šlach a orgánů. Jedním z těchto nových materiálů je i kopolymer PLGA; velkou předností toho kopolymeru je zejména jeho vysoká kompatibilita se živými tkáněmi a časově ovlivnitelná biodegradabilita. Tento kopolymer je navíc schopen s sebou nést léčivé látky, které se tak dostanou přímo k postiženému místu. Tím dochází k rychlejšímu hojení postiženého místa a ke snížení negativní odezvy okolní tkáně, tedy ke snížení rizika infekce a rychlejšímu uzdravení. Díky zmíněným vlastnostem kopolymeru PLGA existuje důvodný předpoklad, že bude vyhovovat požadavkům lékařů a také svojí funkcí plně nahradí postižené tkáně u lidí.

Úkolem této diplomové práce bude zjistit vliv rozpouštědel na elektrostatické zvlákňování kopolymeru PLGA. Dalším úkolem bude stanovit vhodný poměr rozpouštědel a vytvořit roztok, který bude vhodný pro elektrostatické zvlákňování, tedy pokusit se ovlivnit samotný proces elektrostatického zvlákňování a z roztoku vytvořit nanovláknennou vrstvu, tedy vrstvu z biodegradabilního polymeru PLGA vhodnou pro kultivaci buněk s požadovanými mechanickými vlastnostmi.

2. Teoretická část

2.1 Elektrostatické zvlákňování

Elektrostatické zvlákňování je proces, při kterém dochází k tvorbě elektricky nabitého proudu polymerního roztoku nebo taveniny [1] vlivem elektrostatických sil.

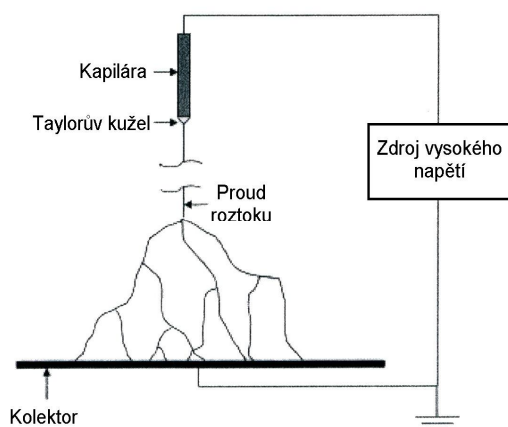
2.1.1 Historie elektrostatického zvlákňování

První si všiml vlivu elektrostatického pole na kapalinu na počátku 17. století mnich William Gillbert. Při pokusu s ebonitovou tyčí a kapkou vody umístěnou na podložce pozoroval pohyb kapky směrem k nabitě tyči. V roce 1914 John Zeleny působící na univerzitě v Minnesotě vynalezl jednoduchý spinner. Mezi lety 1934 až 1944 publikoval řadu patentů Formhals [2-4]. V roce 1964 prezentoval svou práci sir Geoffrey Taylor [5], který zkoumal vliv homogenního elektrického pole na hladinu vody. Pozoroval emisi částic, které předcházelo vytvoření dokonalého kužele na hladině, který byl po vědci pojmenován Taylorův kužel. Následovala řada výzkumů zabývajících se zvlákňováním různých polymerů, uvedeno v [1]. Koncem sedmdesátých let bylo patentováno zařízení nazvané drátový stroj [6]. V roce 2004 bylo Technickou univerzitou v Liberci patentováno zvlákňovací zařízení nazvané Nanospider [5].

2.1.2 Princip elektrostatického zvlákňování

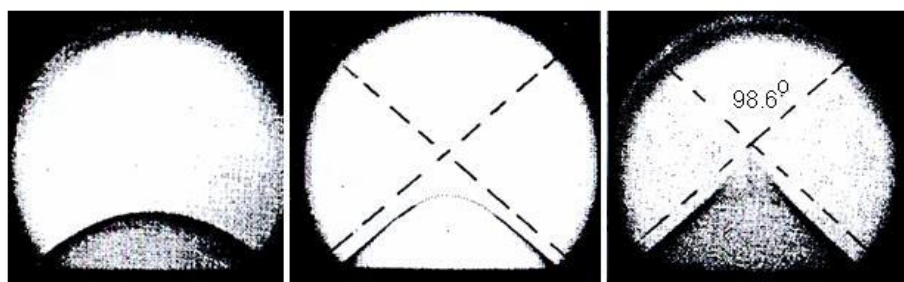
Elektrostatické zvlákňování (elektrospinning) je postup, který se jako jediný zdá být schopen masové výroby jednotlivých kontinuálních nanovláken různých polymerů, a tedy komerčně využitelný [7]. Nanovlákná jsou vlákna, jejichž průměr se pohybuje v submikronové oblasti, tedy v rozsahu do 1000 nm [1]. Schéma procesu elektrostatického zvlákňování je znázorněno na obr. 1, jedná se zde pouze o jedno z možných uspořádání zvlákňovacího zařízení, kdy dáváme přednost svisle umístěné kapiláře a pod ní umístěným kolektorem, další možná uspořádání jsou uvedena

v pramenu [1]. Roztok polymeru odkapává z kapiláry vlivem gravitace a získaná vlákna se ukládají na kolektoru.



Obr. 1 – schéma jednoduchého zvlákňovacího zařízení, čerpáno z [1]

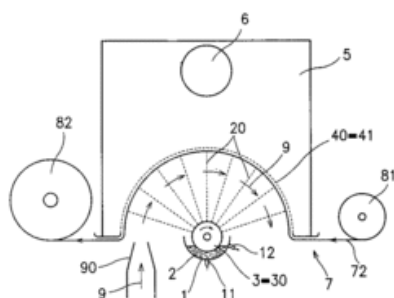
V procesu elektrostatického zvlákňování je využito vysokého napětí k vytvoření elektricky nabitého proudu polymerního roztoku nebo taveniny. Jedna z elektrod je spojena přímo s polymerním roztokem (kapilára), druhá tvoří kolektor. Roztok je tedy vystaven působení elektrického pole. Dojde k indukci elektrického náboje v povrchové vrstvě roztoku, a pokud je elektrické pole dostatečně silné, je překonáno povrchové napětí kapaliny. Na hladině polymeru dojde k tvorbě Taylorových kuželů (viz obr. 2). Obvodem začne procházet elektrický proud a polymerní roztok je strháván z Taylorových kuželů směrem ke kolektoru.



Obr. 2 – Tvorba Taylorova kuželu na hladině kapaliny v silném elektrostatickém poli, čerpáno z [8]

2.1.3 Nanospider

Zařízení Nanospider bylo vyvinuto na Katedře netkaných textilií Technické univerzity v Liberci. Jeho produktivita je výrazně vyšší než produktivita předchozích vynálezů, a to díky absenci jakýchkoli trysek či zvlákňovacích kapilár [1]. Schéma tohoto zařízení je uvedeno na obr. 3. K tvorbě nanovláken dochází na rotující elektrodě tvaru válce, jejíž spodní okraj je umístěn v polymerním roztoku. Nad ní je umístěna protielektroda, po které je vedena podkladová textilie, na níž vzniká nanovláknenná vrstva.



Obr. 3 – zařízení Nanospider pro výrobu nanovláken elektrostatickým zvlákňováním, čerpáno z [5]

2.2 PLA - kyselina polymléčná

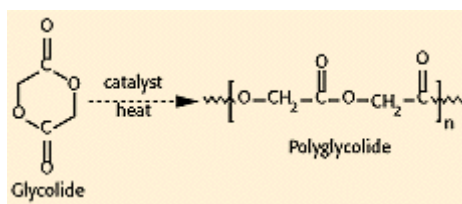
Kyselina mléčná existuje ve dvou izomerních formách, D a L. Označení D a L znamená, že kyselina mléčná stáčí rovinu polarizovaného světla buď napravo (D) nebo nalevo (L). Formy D a L jsou přirozené, kdežto kyselina DL-mléčná je synteticky vyrobená smícháním formy D a L. Kyselina L-polymléčná (L-PLA) je semikrystalická. Tyto druhy materiálů vykazují vysokou pevnost v tahu a malé prodloužení. Z toho vyplývá, že mají vysoký modul, který je vhodný při použití polymeru pro nosné aplikace (ortopedie). Kyselina DL-polymléčná (DL-PLA) je amorfni polymer vykazující náhodné rozdělení obou izomerických forem kyseliny mléčné, a proto je neschopný vytvořit organizované krystalické struktury. Tento materiál má nižší pevnost v tahu, vyšší prodloužení a mnohem rychlejší čas degradace, čehož lze využít pro lékový doručovací systém. L-PLA je asi ze 37% krystalický, s bodem tání 175°C až 178°C a

teplotou skelného přechodu 60-65°C. Doba degradace LPLA je o dost pomalejší než má DL-PLA a trvá asi dva roky k úplné absorpci. Kopolyмеры L-PLA a D-LPLA zrychlují degradační proces [9].

Degradace:

Prvním stupněm degradace je hydrolýza. U polymeru PLA vystavenému vodnému prostředí dochází k sorpci vody a následnému štěpení esterových vazeb. Částečně degradované makromolekuly zůstanou homogenně rozptýleny ve vodné fázi. Tento proces trvá zhruba 14 dní. Následně jsou produkty vzniklé degradací metabolizovány na CO₂ a vodu a vyloučeny z těla ven [10].

2.3 PGA - kyselina polyglykolová



Kyselina polyglykolová je nejjednodušší lineární alifatický polyester. Je velmi krystalický (45 až 55 %), s vysokým bodem tání (220 až 225° C) a teplotou skelného přechodu 35-40°C. Kvůli vysoké míře krystalizace není rozpustná ve většině organických rozpouštědel; výjimkou je hexafluoroizopropanol. Vlákná PGA vykazují vysokou pevnost a modul - jsou velmi tuhá. Švy PGA ztrácí asi 50 % pevnosti po 2 týdnech a 100 % pevnosti po 4 týdnech. K úplné absorpci dochází za 3-6 měsíců. Kopolyмеры PGA s jinými monomery redukuje ztuhlost výsledných vláken [11].

Degradace:

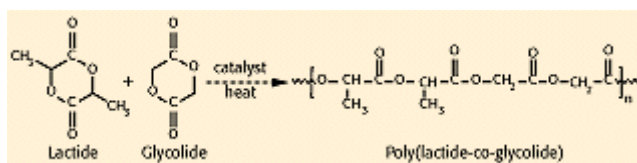
PGA polymer je rozkládán nejen biodegradací, ale i hydrolytickou degradací. Biodegradace je proces, při kterém je PGA rozkládán jednou či více chemikáliemi z biologických procesů. Hydrolytická degradace způsobuje rozklad materiálu

fyzikálními či chemickými interakcemi s vodou. Největší význam na poklesu mechanické pevnosti PGA polymerů má hydrolytická degradace. Ta se opírá o dvě teorie. První říká, že amorfni oblasti polymeru degradují rychleji a dochází při tom k významnému poklesu mechanických vlastností během dnů až týdnů. Druhá teorie mluví o krystalických oblastech, které degradují pomaleji a jsou v polymeru přítomny až do jeho úplného rozpadu. Tyto teorie byly potvrzeny řadou testů zmíněných v kapitole 3.8. této práce. Z provedených testů vyplývá, že hydrolytická degradace PGA probíhá ve čtyřech fázích [10]:

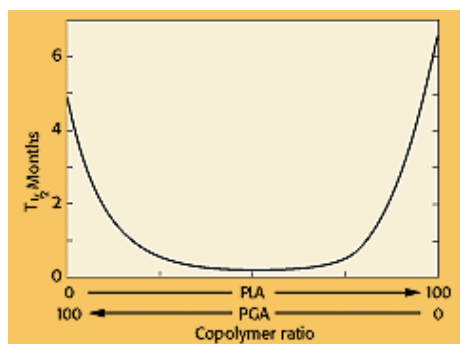
1. Dochází k homogennímu rozšiřování vody do vzorku a drastickému poklesu teploty zesklenní. Tento proces nastává během prvních 6 hodin.
2. Nastává homogenní hydrolýza, kdy dochází k absorbování vody. Tím je polymerní řetězec krácen až do doby, kdy polymer dosáhne kritické molekulové hmotnosti. Dochází k porušování amorfni části. Toto trvá prvních deset dnů.
3. Přejít mezi druhou a třetí fází je indikován významným poklesem pH. Pokles pH urychluje degradaci vzorku a jeho výsledkem je porušení krystalické fáze.
4. Uvnitř vzorku jsou přítomny jen malé části krystalické fáze a dochází ke ztrátě stavební integrity.

Degradace probíhá tedy ve čtyřech stupních: 1. hydratace, 2. ztráta pevnosti v tahu způsobená rozštěpením řetězce, 3. ztráta hmoty a 4. solubilizace (převádění obtížně rozpustných látek do vodného roztoku). Degradace PGA závisí na teplotě, pH, molekulové hmotnosti a stupni krystalinity. Rozpad PGA může být urychlen např. karboxypeptidy a zpomalován určitými proteiny. Rozklad PGA mezi 1-4 týdnem probíhá velmi rychle a krystalinita zbylého polymeru se zvětšuje. Poté dochází k pomalejšímu úbytku hmotnosti i krystalinity [11].

2.4 PLA-PGA - kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové



Kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové vzniká kopolymerizací dvou monomerů: PGA a PLA. Tímto lze rozšířit rozsah vlastností homopolymeru. Kopolymery PGA s oběma formami LPLA a DLPLA byly vyvinuty pro cílený transport léčiv. Za povšimnutí stojí to, že mezi složením kopolymeru a mechanickými a degradačními vlastnostmi materiálů neplatí lineární vztah. Například kopolymer ve složení 50% PGA a 50% DLPLA degraduje rychleji než jeden či druhý homopolymer. Kopolymer ve složení 90% PGA a 10% LPLA byl vyvinut firmou Ethicon jako absorbovatelný šicí materiál pod názvem Vicryl [9]. Závislost složení PLGA na čase rozpadu je znázorněna na obr. 4.



Obr. 4 – Závislost složení kopolymeru na čase rozpadu, čerpáno z [9]

Přehled polymerů a jejich vlastností je uveden v tabulce 1. Zkratky znamenají: PGA: kyselina polyglykolová, L-PLA: kyselina L-polymléčná, DL-PLA: kyselina DL-polymléčná, D-LPLG: kopolymer kyseliny polymléčné a polyglykolové,.

Polymer	Teplota tání (°C)	Teplota zesklnění (°C)	Modul (Gpa)	Čas degradace (měsíce)
PGA	225—230	35—40	7	6 až 12
LPLA	173—178	60—65	2,70	>24
DLPLA	Amorfní	55—60	1,90	12 až 16
85/15 DLPLG	Amorfní	50—55	2,00	5 až 6
75/25 DLPLG	Amorfní	50—55	2,00	4 až 5
65/35 DLPLG	Amorfní	45—50	2,00	3 až 4
50/50 DLPLG	Amorfní	45—50	2,00	1 až 2
75/25 DLPLG	Amorfní	50—55	2,00	4 až 5
65/35 DLPLG	Amorfní	45—50	2,00	3 až 4
50/50 DLPLG	Amorfní	45—50	2,00	1 až 2

Tab. 1 - Přehled vybraných polymerů a jejich vlastností, čerpáno z [10]

2.5 Biodegradabilita, biokompatibilita, sterilizace [9]

2.5.1 Biodegradabilita

Biodegradabilní polymery mohou být přírodní nebo syntetické. Syntetické neboli uměle vyrobené polymery nabízejí výhody oproti přírodním, neboť mohou být přizpůsobeny širšímu rozsahu použití, představují také spolehlivější zdroj nových materiálů pro podávání léčiv. Hlavní kritéria pro výběr polymeru určují jeho mechanické vlastnosti. Mechanické vlastnosti se musí dostatečně blížit okolní tkáni; nesmí vyvolat zánětlivé, nebo toxické reakce okolní tkáně. Po splnění svojí funkce bude PLGA vyloučen z těla ven. PLGA musí být rovněž snadno zpracovatelný do finální aplikační formy, dále by měl být sterilizovatelný a skladovatelný. Faktory ovlivňující mechanické vlastnosti jsou závislé na výběru monomeru, iniciátoru, výrobních podmínkách a příměsích. Všechny tyto parametry ovlivňují hygroskopicitu, bod tání a skelný přechod a molekulovou hmotnost. Biodegradabilita je také

negativně ovlivněna syntézou polymerů, které mají vodíkové můstky, charakteristickými skupinami jsou estery.

2.5.2 Biokompatibilita

Implantovaný materiál musí plnit během několika let svoji funkci, ale přesto nesmí vyvolávat negativní odezvu okolní tkáně. Proto nesmí produkovat žádné toxické nebo rakovinotvorné látky. Při degradaci se tyto materiály tedy nesmí měnit na toxické látky, které by narušovaly proces hojení. Biodegradabilní materiály mohou sloužit a plnit svoji funkci, pokud budou uvolňovat látky vhodné k hojení okolní tkáně (vitamíny, medikamenty), poté se také tyto materiály začnou rozkládat a vylučovat z těla ven. PLGA materiály zaručují dostatečnou biokompatibilitu a nepřítomnost závažné toxicity, která způsobuje závažné bujení v buňce.

Buněčné bujení bylo sledováno u PLGA o různých molekulových hmotnostech na pojivových buňkách u potkanů. Výsledkem byla dostatečná biokompatibilita PLGA. Užití PLGA jako chirurgické nitě se velice osvědčilo, proto zde je určitá možnost využít PLGA jako implantát svalově-kostní tkáně. [9]

Aplikace v medicíně

V 60. a 70. letech byla vyvinuta chirurgická nit, která se snadno vstřebávala a byla označena jako Dexon (100%PLA) a vicryl (90%PGA-10%PLA). Tyto materiály otevřely dveře biodegradabilním materiálům, v medicíně se potom začaly používat převážně pro fixaci zlomenin. Nejprve se PLA začala aplikovat na zlomeniny kotníků, loktů a jiných velkých kloubů. Později se také začala používat na lebeční zlomeniny zejména jařmových oblouků. Bylo potvrzeno, že PLA je bezpečná a efektivní alternativa za chirurgickou ocel. Neposkytuje úplně stejný mezikostní prorůst zlomených částí jako u chirurgické ocele, ale zaručuje dostatečný prorůst pro další hojení a vyhne se odstranění šroubů a spon. U takto implantovaných PLA a PGA materiálů se obvykle objeví zánětlivá reakce do 7-20 týdnů, ale problém se následně během několika týdnů ztratí. Předpokládá se, že výskyt zánětu závisí spíše na těch místech v těle, kam se implantát aplikoval, než na implantovaném materiálu. Komplikace mohou být ale také připsány místnímu odvodnění tkáně, věku pacienta, tolerancí tkáně na polymer a objemem implantovaného polymeru. Později by bylo

možné nepříznivé odezvy implantovaných materiálů minimalizovat kontrolou kvality materiálu a zásob a také snížením nečistot v polymeru a volných monomerů. [9]

Současné a budoucí aplikace

PLA – PGA polymery se začínají široce uplatňovat v ortopedii, zejména jako náhrady kostí, skafoldy pro tkáňový vrůst. Biodegradabilita a biokompatibilita těchto polymerů je k takovému použití vhodná pro svoje mechanické vlastnosti a nabízí se pro další uplatnění jako náhrada chrupavek, vaziv a šlach. Jako náhrada chrupavky byl již použit polymer 50-50 PLA-PGA, který měl zajistit obnovu staré chrupavky a také zajistit růst nové chrupavky i nové kosti přímo pod chrupavkou. Polymer, který byl implantován, dodával proteiny na postižené místo, ale také sloužil jako skafold pro růst nové tkáně. Když se tento implantát testoval in vitro, tak si po dobu deseti týdnů udržoval původní tvar a časem došlo k úplné degradaci. [11]

Mechanické vlastnosti dlouhých kostí běžně překročí mechanické vlastnosti PLA-PGA materiálů, je tedy nutné zesílit polymer vlákny s vyšší pevností. Jako nejvhodnější se zatím ukazují karbonová vlákna nebo vlákna samotného polymeru. Z polymeru by se vytvořily jakési svazky nebo šlahouny a ty by se spekly za teploty 205 – 232 °C a za vyššího tlaku. Jako svazky by se mohly použít již používané šicí nitě označované Dexon.

PLA-PGA je přírodní polymer, který je rozpustný v mnoha organických rozpouštědlech. Může být zpracováván do rozmanitých tvarů a forem a pro své vynikající vlastnosti v dodávkách léků na místo určení bude používán jako biologický štep nebo scaffold pro růst nové tkáně. V budoucnu budeme také schopni ve větší míře objasnit vlastnosti současných PLA-PGA implantátů a dále je podle potřeby modifikovat tak, aby vyhovovaly novým požadavkům. PLA-PGA kopolymery budou také v budoucnu více používány jako vlákna a kompozity pro plnohodnotné uzdravení postižených míst jako jsou šlachy, vazy a kosti. Dále bude zlepšena kontrola cizích látek v polymeru a tím se dosáhne kontroly pH v živé tkáni a okolí implantovaného materiálu. Tyto parametry mohou hrát zásadní roli v zotavování svalové tkáně a budoucích aplikacích PLA-PGA.

2.5.3 Sterilizace

Všechny materiály, které se implantují do těla, je nutné sterilizovat. Sterilizace se provádí k usmrcení virů a bakterií, které by mohly znepríjemnit proces hojení. Nejběžnější sterilizace jsou teplem, vodní párou, zářením a kombinací těchto metod. PLA-PGA polymery jsou náchylné ke zničení vlhkostí a zářením, citlivé jsou také na teplo, protože mají termoplastickou povahu. Výběr správné sterilizace je tak pro PLA implantáty rozhodující, v důsledku výběru nesprávné sterilizace by mohlo dojít ke ztrátě fyzikálně-mechanických vlastností PLA. Na základě provedeného testu sterilizace PLA s vodní párou bylo zjištěno [9], že sterilizace má významný vliv na materiálové vlastnosti polymeru. Molekulární hmotnost se při sterilizaci snižovala ve všech případech, ačkoliv ve většině případů elastický modul inklinoval ke zvýšení. Autoři testu uvádějí, že sterilizace při 129 °C po dobu 60 sekund způsobila minimální změny v tahových vlastnostech testované L-PLA. Z této metody nicméně vyplývá, že značně klesá molekulová hmotnost, která může ovlivnit pokles kinetiky polymeru.

Záření používané ke sterilizaci způsobuje štěpení řetězce PLA-PGA. Dochází k tomu při malých dávkách 2,5 mrad. Čím větší dávky ozáření působí na PLA, tím více klesá molekulová hmotnost tohoto polymeru. Čím rychleji klesá molekulová hmotnost, tím více se zkracují řetězce PLA. Autoři předpokládají, že hlavním mechanismem tohoto zkracování bylo pravděpodobně otevírání řetězců. Studie předpokládá, že ačkoliv počáteční tahová síla hned po ozáření zůstává nezměněna, po deseti dnech po implantaci klesá k nule. Ostatní studie také uvádějí, že tažnost PLA-PGA klesá vlivem γ -zářením. V živých podmínkách ozářená PGA degraduje rychleji než neozářená, tento rozdíl by mohl souviset s poklesem molekulové hmotnosti ozářeného vzorku. Proto je důležité mít souvislost vlastností a doby životnosti PLA-PGA. PLA-PGA může být dále výrazně ovlivněna radiací.

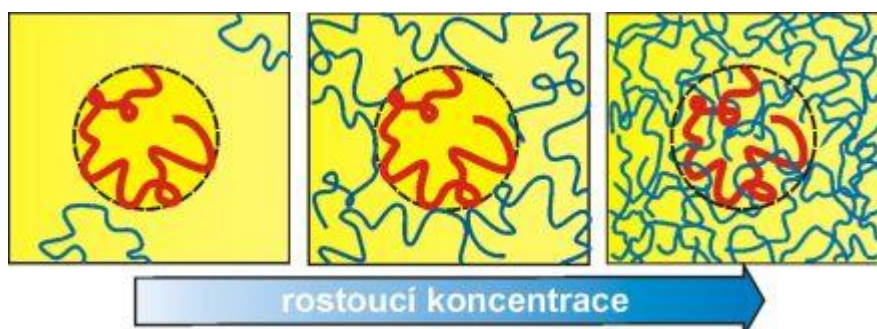
Sterilizace plynem jako je ethylen oxid je často používána pro polymery, které jsou citlivé na vlhko a teplo. To také platí pro PLA-PGA, který je termoplastická. Chemická sterilizace může kdykoliv zanechat potencionální zbytek škodlivých částic na okolí i uvnitř polymeru. Množství plynu absorbovaného do polymeru závisí na rovnovážné absorpci a difuzním koeficientu; tyto fyzikální parametry závisí na typu polymeru a na sterilizačních parametrech. Polymer musí být po sterilizaci málo zamořen plynem, aby se dal implantovat. Bylo zjištěno, že proces provzdušnění se

významně zlepšit mikrovlnným zářením, protože toto záření snižuje o $\frac{1}{2}$ aktivační energii pro difuzi polymeru.

2.6 Rozpouštědla [12]

Tato kapitola se podrobně zabývá popisem použitých rozpouštědel, která byla použita pro přípravu roztoků PLGA v experimentální části. Tato rozpouštědla byla dodána společností Fischer scientific. Jednotlivá rozpouštědla jsou rozdělena do jednotlivých podkapitol.

Ve zředěných roztocích jsou makromolekuly od sebe dostatečně vzdálené, takže každé makromolekulární klubko je obklopeno jen molekulami rozpouštědla. V roztoku se vyskytují různě svinuté řetězce, jejichž konformace se mění u každé makromolekuly s časem. Tepelný pohyb a otáčivost jednotlivých článků jsou do značné míry ovlivněny prostorovými zábranami, jež mohou být způsobeny přítomností objemných substituentů. Stupeň svinutí makromolekulárního klubka v roztoku potom závisí na afinitě segmentu makromolekulárního řetězce k rozpouštědlu, která je výsledkem tří dílčích interakcí: interakcí polymer-polymer, polymer-rozpouštědlo a interakcí mezi molekulami rozpouštědla. V dobrých rozpouštědlech se makromolekula snaží vystavit působení rozpouštědla co nejvíce svých částí; střední vzdálenost konců a tedy i objem klubka se zvětšuje, proniká do něj další rozpouštědlo - klubko bobtná. Ve špatných rozpouštědlech je klubko více svinuté, protože dochází spíše k vytváření kontaktů mezi jednotlivými segmenty makromolekuly, než k jejich styku s molekulami rozpouštědla. Rozpouštědla, v nichž jsou vzájemné interakce vyrovnané, se nazývají indiferentní neboli theta-rozpouštědla (řetězce makromolekul se chovají, jakoby byly tvořeny pouze hmotnými body, při náhodném setkání si navzájem nepřekáží ani spolu neinteragují). Takového chování se však dosáhne jen za určitých podmínek. Kvalita rozpouštědla se mění s teplotou - theta podmínky pro danou dvojici polymer-rozpouštědlo existují při jediné teplotě - tzv. theta-teplotě. Při vyšších teplotách se klubko rozvine, pod touto teplotou klubko svůj objem zmenšuje.



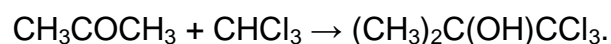
Obr.5 - Struktura různě koncentrovaných roztoků polymerů

čárkovaná čára – hranice domény klubka; mezery mezi řetězci jsou vyplněny molekulami rozpouštědla

V koncentrovanějších roztocích přichází mnoho článků řetězce do styku s články jiných vysokomolekulárních řetězců přítomných v roztoku, jednotlivé řetězce jsou pak propleteny a počet kontaktů (entanglements) mezi segmenty různých makromolekul roste s koncentrací. V jednodušších soustavách (stejnorodý řetězec v dobrém nebo theta-rozpouštědle) jsou tyto kontakty jen krátkodobé, rozbíjejí se tepelným pohybem a vytvářejí se opět na jiných místech. Při počínající fázové separaci nebo u nestejnorodých řetězců, které místy obsahují chemicky nebo strukturně odlišné skupiny, se mohou objevit trvalejší a pevnější spoje, vytvářející větvené asociační struktury. Po dosažení kritické (často malé) koncentrace polymeru z nich mohou vznikat reverzibilní gely.

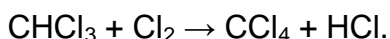
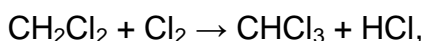
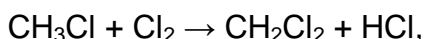
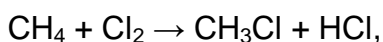
2.6.1 Chloroform [13]

Molekula chloroformu má jednu trojčetnou osu symetrie a tři roviny symetrie. Protože tato molekula nemá střed symetrie, je vzhledem ke značné polaritě vazeb C—Cl celá molekula polární (dipólový moment 1,08 D). Díky tomu je chloroform velmi dobrým rozpouštědlem zejména tuků. Kromě toho polarita vazeb C—Cl způsobuje, že vodíkový atom molekuly chloroformu je značně reaktivní. V zásaditém prostředí reaguje chloroform s aldehydy a ketony za vzniku sekundárních resp. terciálních alkoholů.



Příprava:

Průmyslově se chloroform vyrábí zahříváním směsi chloru s chlormethanem nebo methanem na teplotu 400–500 °C. Při této teplotě se nejprve uvolní radikál chlóru a postupně nahradí v methanu nebo chlormethanu vodíkové atomy, čímž vznikne směs čtyř chlorovaných uhlovodíků (chlormethan, dichlormethan, trichlormethan - chloroform a tetrachlormethan).



Vzniklá směs se pak rozdělí destilací na jednotlivé čisté sloučeniny.

Použití

Koncem 19. a 20. století byl chloroform používán při operacích jako inhalační anestetikum. Dnes je chloroform používán v chemickém průmyslu, a to hlavně při výrobě chladicího media pro ledničky a klimatizace, freonu R-22 (chlordifluormethan, CHClF_2). Chloroform se též používá jako rozpouštědlo v chemické laboratoři, ve farmaceutickém průmyslu a při výrobě pesticidů a nátěrových hmot. Je výborným lepidlem některých plastů, např. polystyrenu nebo plexiskla.

Fyziologické působení

Inhalace par chloroformu vede ke tlumení centrálního nervového systému. Vdechování vzduchu obsahujícího 900 ppm po krátkou dobu způsobuje závratě, ospalost a bolesti hlavy. Chronická expozice potom způsobuje poškození jater (hepatotoxicita), kde se chloroform metabolizuje na fosgen, a ledvin (hepatorenální selhání). Dráždí také sliznice a oční spojivky.

Do těla může chloroform pronikat jak vdechováním, tak požitím ústy, nebo vstřebáním pokožkou. Větší dávky chloroformu mohou způsobit chronické otravy, případně až smrt. Příčinou smrti může být deprese dechového centra nebo srdeční arytmie. Nejnižší smrtelná dávka LDLo pozorovaná u člověka při požití byla 2514 mg/kg.

2.6.2 Aceton [14]

Aceton je triviální pojmenování pro propan-2-on nebo též dimethylketon. Charakteristickou skupinou je karbonyl. Aceton je bezbarvá kapalina specifického zápachu, hořlavá, s vodou neomezeně mísitelná. Směs jeho par s kyslíkem je výbušná. Používá se jako rozpouštědlo organických látek. Aceton je toxický a karcinogenní.

Reaktivitu acetonu dodává přítomnost karbonylové skupiny. Kyslík má větší elektronegativitu než uhlík, a proto tuto vazbu polarizuje tak, že na kyslíku se vytváří parciální záporný a na uhlíku parciální kladný náboj. Aceton tedy reaguje s nukleofilními činidly, které mají přebytek elektronů.

Výskyt

V lidském organismu vzniká aceton v malém množství spontánní dekarboxylací acetacetátu, látky, která vzniká v játrech při zpracování mastných kyselin (z tuků). Aceton je vydycháván v plicích. Při diabetu se tvoří zvýšené množství ketolátek, proto je dech diabetiků cítit po acetonu.

2.6.3 Dichlorethan [15]

Použití

Mezi hlavní a nejdůležitější použití 1,2-dichlorethanu patří výroba vinylchloridu. Vinylchlorid je surovina pro výrobu polyvinylchloridu (PVC), což je běžně užívaná plastická hmota. Mezi další možné aplikace 1,2-dichlorethanu patří výroba acetylcelulózy a tabákových extraktů.

Dopady na životní prostředí

1,2-dichlorethan zařazujeme mezi tekavé organické sloučeniny (VOC), jako jedna z látek této skupiny přispívá ke vzniku fotochemického smogu. 1,2-dichlorethan je v ovzduší relativně stabilní látkou s dobou životnosti mezi 100 a 180 dny, proto může být při větších únicích transportován na velké vzdálenosti. Z povrchových vod se 1,2-dichlorethan odparuje do ovzduší.

Dopady na zdraví člověka, rizika

1,2-dichlorethan je obecně zdraví škodlivá látka. Tato látka může do těla exponované osoby proniknout vdechnutím, požitím, ale i pokožkou. U zasažené osoby se mohou projevit příznaky poškození dýchacích orgánů, nevolnost, zvracení, závratě, bolest hlavy, poškození jater a ledvin. Při chronickém působení 1,2-dichlorethanu hrozí riziko onemocnění rakovinou.

2.7 Vliv rozpouštědel na elektrostatické zvlákňování

U polymerních roztoků je rozpouštědlo hlavním činitelem, které ovlivňuje vlastnosti výsledného roztoku, např. vodivost. Voda je dobrým rozpouštědlem pro PEO - polyethylenoxid a byla úspěšně použita při zvlákňování PEO. Pokud ethanol přidáme do vody a docílíme smíchání obou složek, pak průměr PEO vláken vzniklých elektrostatickým zvlákňováním bude větší. Důvodem tohoto zvětšení je zmíněné snížení hustoty náboje dosažené nábojem proudu, vzrůstem viskozity a vyšší výparností dosažené smícháním rozpouštědel. Rozpouštědla s vysokým výparným tlakem, např. CS_2 byla diskutována k objevení nanopórů při elektrostatickém zvlákňování polystyrenu (dále jen PS). Trichlormetan - chloroform (CHCl_3) byl shledán jako nejlepší rozpouštědlo pro výrobu vysoko strukturovaných PMMA vláken.

Účinek a vlastnosti rozpouštědel mají zásadní vliv na elektrostatické zvlákňování PS a na morfologii vláken. Vzniklá vlákna byla sledována na SEM skenovacím elektronovém mikroskopu a byly posuzovány různé účinky osmnácti různých rozpouštědel. U některých byl pozorován kladný efekt na zvlákňování, naopak u některých nebyl PS zvlákňitelný. Na základě výsledků pozorování byly stanoveny důležité faktory, které ovlivňují elektrospining a přípravu roztoku. Výsledkem jsou dosti vysoké hodnoty dipolového momentu rozpouštědel a vysoká vodivost, nižší bod varu a malá viskozita [16].

Výsledný vzhled usazených vláken na kolektoru záleží na mnoha okolnostech. Mezi ně patří viskoelastické síly, které závisí na viskozitě a koncentraci, dále molekulová hmotnost polymeru a viskozita rozpouštědla, okolní tlaky a vlhkost, velikost elektrostatického pole, vzdálenost obou elektrod a vodivost roztoku polymeru.

K výrobě PS nanovláken bylo použito přibližně 6 rozpouštědel o různých vlastnostech, např. hustotě, bodu varu, rozpustnosti, dipolovém momentu atd. Pro

pozorování byly záměrně vybrány rozpouštědla s velmi rozdílnými chemickými vlastnostmi. Během pozorování se sledoval počet vláken na jednotku plochy, byl také pozorován vliv přírůstku dielektrické konstanty a dipólový moment u různých rozpouštědel. Mezi vyšetřovanými rozpouštědly byl nejlepší DMF pro výrobu nejvyšší kvality PS nanovláken s nejvyšší produktivitou a optimálními morfologickými vlastnostmi.

Chloroform:

Chloroform byl schopen rozpustit PS kuličky na čirý roztok během jednoho dne. Zvláknění roztoku PS a rozpouštědla chloroformu šlo relativně lehce. Bylo pozorováno velice malé množství PS nanovláken, vzniklo mnoho globulárních útvarů, neboli kuliček, které vznikaly při elektrospínání a usazovaly se na kolektoru. Se vzrůstající koncentrací PS roztoku až k 30% se tyto kuličky přestaly objevovat a usazovala se pouze samotná vlákna. Bližší zkoumání vláken s vyšším zvětšením odhalilo, že povrch vláken byl dosti hrubý s kruhovým průřezem; hrubý povrch vláken se mohl vytvořit díky nízkému bodu varu, který chloroform vykazuje.

Dichlorethan:

Dichlorethan byl schopen rozpustit PS kuličky na čirý roztok během dvou dnů. Tento roztok byl velice dobře zvláknitelný v důsledku relativně vysokého dipólového momentu rozpouštědla a dobré hodnotě vodivosti rozpouštědla. Z obou roztoků o koncentracích 10% a 20% bylo získáno velké množství jemných i tlustších vláken, vlákna se zvlákněvala při 20kV. Bylo zjištěno, že se vzrůstající vzdáleností kolektoru vzrůstal poměr silnějších vláken. Při konstantní vzdálenosti 100mm byl pozorován pokles zesílených vláken se vzrůstajícím napětím. S dalším vzrůstem koncentrace až k 30 % se tvořila převážně jemná vlákna a ubýval počet tlustých vláken. Pozorování vláken pod mikroskopem odhalilo zajímavý tvar vláken v průřezu, který se podobal písmenu C. Výsledkem borcení kruhovitěho tvaru vláken bylo velice rychlé odpaření rozpouštědla z roztoku.

Dimethylformamid (DMF):

Dimethylformamid byl schopen rozpustit PS kuličky na čirý roztok během šesti hodin. Roztok byl zvláknitelný neobyčejně snadno, vzhledem k relativně vysokému dipólovému momentu a relativně vysoké vodivosti. Předpokladem pro zvláknění

bylo napětí 20 kV a vzdálenost 70mm. Při koncentraci 10% byl vzorek plný jemných a obroubených vláken. Bylo rovněž pozorováno splynutí sousedních vláken; toto splynutí mohlo být vysvětleno na základě relativně vysokého bodu varu rozpouštědla (153°C), a tudíž nedostatku času k odpaření rozpouštědla na trnu a následného schnutí vláken až na emitoru. Při napětí 20 kV byla objevena souvislost mezi velikostí korálků a vzdáleností elektrod, bylo zjištěno, že vzrůstající vzdáleností vzrůstal počet defektů. Pro pevnou vzdálenost elektrod 100mm bylo pozorováno zvětšování korálkových defektů se vzrůstajícím potenciálem. Se vzrůstající koncentrací roztoku až k 20% se potom dosáhlo menšího množství korálkových defektů. Pro konstantní vzdálenost 100mm bylo množství defektů úměrně ovlivněno vzrůstajícím napětím z 15kV na 25kV. Při koncentraci 30% se objevovala jen tenká vlákna. Pozorování takto připravených vláken při velkém zvětšení prokázalo, že vlákna byla jemná a s kruhovým průřezem.

Ethylacetat:

Ethylacetat rozpustil kuličky během 3 dnů. Viskozity roztoků byly 10, 20 a 30% jako u předchozích roztoků; roztoky byly docela snadno zvláknitelné. Po zvláknění 10% roztoku se objevovala jemná vlákna a kuličkové defekty. Při sledování pod mikroskopem byly kuličkové defekty zploštělé a protažené ve směru osy vlákna, zatímco vlákna byla páskovitého charakteru. Dalo by se předpokládat, že to bylo dáno zejména nízkým bodem varu rozpouštědla (77°C). Poté se zvlákněly roztoky o koncentracích 20% a 30%, výsledná vlákna vykazovala nižší množství páskovitých vláken a také se objevil c- tvar vláken v průřezu. To bylo zapříčiněno rychlým vypařováním rozpouštědla a také částečným zanášením špičky zvláknovacího hrotu.

Toluen:

Toluen byl schopen rozpustit PS za 2 dny. Viskozity roztoků byly 10, 20 a 30%. Při zvlákněování se projevoval elektrospreng a kuličkové defekty se usazovaly mimo místo kolektoru. Při zvlákněování 20 a 30% bylo pozorováno velice malé množství jemných vláken s kruhovým a c- průřezem.

Celkem bylo zkoumáno 18 druhů rozpouštědel na rozpustnost PS, výsledkem byl výběr pěti rozpouštědel - 1,2 dichlorethan, DMF, ethylacetat, MEK a THF, když tato rozpouštědla byla shledána jako velice dobrá pro zvlákněování. Zajímavostí je

také to, že všech pět daných rozpouštědel má mírně vyšší hodnotu dipólového momentu. Při sestupném řazení lze uvedená rozpouštědla uspořádat následně: DMF, 1,2-dichlormethan, MEK, ethylacetat, THF. Uvedená rozpouštědla také vykazuje mírně vyšší hodnotu vodivosti. Lze tedy říci, že dipolový moment a vodivost jsou velice důležité a rozhodující faktory určující schopnost elektrostatického zvlákňování roztoku.

Rozpouštědla přispívají svými vlastnostmi na elektrospining a na kvalitu vláken před připraveného roztoku PS. Morfologický vzhled vláken byl vyšetřen na elektronovém mikroskopu, byla porovnávána rychlost rozpuštění PS kuliček a dále kvalita vzniklých vláken z těchto roztoků.

3. Experimentální část

Cílem experimentální části bylo testovat rozpouštědla, která budou vhodná pro vytvoření roztoku biodegradabilního kopolymeru PLGA. Dalším úkolem bylo nalézt vhodný poměr těchto rozpouštědel, popsat podmínky elektrostatického zvlákňování a z vytvořeného roztoku kopolymeru PLGA vytvořit nanovláknennou vrstvu, která bude mít požadované mechanické vlastnosti. Tato vrstva bude předána k dalšímu testování a bude vhodná pro kultivaci buněk.

3.1 Popis rozpouštědel

Všechna rozpouštědla, která byla použita při přípravě výsledného roztoku, byla dodána společností Fischer Scientific.

3.1.1 Chloroform [17]

Chloroform neboli trichlormethan, je bezbarvá, těkavá, avšak nehořlavá kapalina charakteristického nasládlého zápachu. Jeho páry jsou značně těžší než vzduch (4,12 krát), proto se v uzavřených prostorách hromadí u podlahy a obtížně se vyvětrává. Sumární vzorec chloroformu je CHCl_3 , molární hmotnost 119,378 g/mol, teplota tání je $-63,6\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplota varu je $61,15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hustota je $1,4985\text{ g/cm}^3$ (při $15\text{ }^{\circ}\text{C}$), rozpustnost ve vodě 7,95 g/l (při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.1.2 Aceton [18]

Aceton neboli dimethylketon, propan-2-on, je bezbarvá kapalina specifického zápachu, hořlavá, s vodou neomezeně mísitelná. Směs par acetonu s kyslíkem je výbušná, aceton je toxický a karcinogenní. Používá se jako rozpouštědlo organických látek. Jeho sumární vzorec je $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, molární hmotnost 58,081 g/mol, teplota tání je $-94\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplota varu je $56,29\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za normálních podmínek se aceton vyskytuje v kapalném skupenství. Jeho hustota je $0,7899\text{ g/cm}^3$ (při 20°C).

3.1.3 Dichlorethan [19]

1,2-dichlorethan je čirá bezbarvá kapalina nasládlé vůně. Tato látka se dobře rozpouští v organických rozpouštědlech, je těkáva a je vysoce hořlavá. Teplota varu činí 84,1 °C, bod tání 35,7 °C, hustota 1,250 g/m³, rozpustnost ve vodě 8,6 g/l.

3.1.4 Dichlormethan [20]

Dichlormethan je čirá bezbarvá kapalina, která zapáchá podobně jako ether. Teplota varu činí 39,75 °C, teplota tání -96 °C. Hustota je 1,325 g/m³ a molekulová hmotnost 84,933 g/mol. Dichlormethan je mírně těžší než voda, ve které je částečně rozpustný (rozpustnost je 13,2 kg.m⁻³ při 20 °C). Je nehořlavý, ale s kyslíkem může tvořit výbušnou směs. Dichlormethan řadíme mezi těkávé organické látky.

3.1.5 Ethylacetát [21]

Ethylacetát je také označován jako octan ethylnatý, nebo ethylester kyseliny octové. Je to pohyblivá, bezbarvá, čirá kapalina (při 20 °C), má příjemný ovocný zápach a charakteristickou chuť. S vodou se mísí omezeně, s ethylalkoholem, etherem a acetonem se mísí neomezeně. Jeho sumární vzorec je C₄H₈O₂. Jeho relativní mol. hmotnost je 88,107 g/mol.

3.2 Popis použitého polymeru

Polymer, který byl použit k vytvoření vzorků, byl vyroben společností Lakeshore. Celé označení tohoto polymeru je MEDISORB Polymer 7525 DL High PLGA o celkové hmotnosti 50g; označení 7525 udává poměrné zastoupení kyselin polymléčné a polyglykolové. Poměry těchto kyselin hrají zásadní roli v dalším zpracovávání polymeru. Molekulová hmotnost činí 186 000 g/mol. Procento kopolymerů bylo DL-mléčná 78,2 % a 21,8. Zbytkové monomery byly DL-mléčná 2,7% a E-kaprolakton 0,1%. Polymer bylo nutné uchovávat v chladném prostředí,

protože při delším setrvání při pokojové teplotě docházelo k jeho degradaci, měknutí a polymer tak přecházel do medovitého stavu.

3.3 Popis použitých koncentrací

Pro tvorbu nanovláknenných vrstev byl použit polymer, který byl zmíněn v kapitole 3.2. Z tohoto polymeru byly připraveny roztoky o koncentracích 15 hm%, 10 hm%, 8 hm%, 7 hm% a 6hm%. Navážky byly provedeny s přesností 0,1 g na digitálních vahách s označením JADEVER JHK – 500. Nejprve byla připravena koncentrace 15 hm % PLGA v roztoku s jedním rozpouštědlem, po pokusech o electrospinning byla tato koncentrace určena jako nevyhovující a došlo k postupnému ředění roztoku až na 6 hm%. Měnil se i vzájemný poměr použitých rozpouštědel a také jejich složení. Za optimální je považována koncentrace 8 hm% PLGA ve směsi rozpouštědel chloroform/ aceton v hmotnostním poměru 60:40.

3.3.1 Příprava roztoků

Všechny roztoky byly připraveny následujícím postupem. Nejprve byl proveden výpočet pro stanovení hmotnosti polymeru pro příslušný roztok, dále se stanovil hmotnostní poměr použitých rozpouštědel. Po přípravě rozpouštědel došlo k navážení potřebného množství polymeru. V odměrné baňce došlo k smísení složek. Polymer se choval k rozpouštědlům velice netečně, proto bylo rozpouštění prováděno na magnetickém míchadle s označením (HEIDOLPH MR 3001k) v uzavřené Erlenmayerově baňce o objemu 20 ml. Po dobu 3 – 8 hodin docházelo k míchání polymeru, v závislosti na hmotnostní koncentraci PLGA, za normální teploty.

3.4 Vliv rozpouštědel na electrospinning

3.4.1 Dichlormethan

Při prvních pokusech prováděných na tyčce byl použit roztok polymeru v čistém rozpouštědle (dichlormethan), o objemu 20 ml, koncentraci 15 hmot. % PLGA.

Z tohoto roztoku se v elektrickém poli netvořila žádná vlákna a roztok se choval v elektrickém poli velice netečně. Z tohoto důvodu byla pokusně snížena koncentrace asi na 10 hmot. %. Po tomto snížení koncentrace se roztok při 40 kV a vzdálenosti 80mm prostupně začínal zvlákňovat. Na okrajích hrotu se tvořila korunka, z kapky na hrotu se vytahovaly kusy polymeru a docházelo k velkým odletům mimo kolektor. Byla tedy zvolena úprava vodivosti a to pomocí TEAB (tetraethylamoniumbromid). Tato úprava však také nepřispěla k lepší tvorbě nanovláknenné vrstvy.

3.4.2 Směs dichlorethanu a octanu ethylnatého

Při tomto pokusu byl použit roztok 15 hmot. % PLGA s dichlormethanem o objemu 2ml, do kterého byl přidán octan ethylnatý o objemu 0,2 ml; vzdálenost elektrod byla 70mm a napětí 28 kV. Při těchto podmínkách došlo k velice rychlé reakci polymeru na napětí, docházelo k elektrospayingu, tedy k tvorbě kapiček, které se usazovaly na kolektoru. Tento jev byl nežádoucí, proto jsem tuto kombinaci rozpouštědel již dále nezkoumal.

3.4.3 Směs chloroformu a acetonu

Roztok o koncentraci 15 hmot % a objemu 5 ml se základním rozpouštědlem chloroform byl nanesen na elektrodu při vzdálenosti 64 mm a napětí zdroje 22 kV a byl zvlákňován. Po dosažení napětí se kapka na hrotu začala z kulovitého tvaru mírně deformovat na tvar elipsy. V tomto případě nenastalo zvlákňování a nevytvořila se ani korunka na okrajích hrotu. Proto bylo přidáno další rozpouštědlo tedy aceton. Po několika pokusech s poměrem těchto dvou rozpouštědel se nejvhodněji jevil poměr rozpouštědel chloroform /acetonu (2:1). Při stejných podmínkách docházelo ke zvlákňování jen z určitých částí polymeru a na kolektoru se podle toho tvořila místa usazování nanovláken. Tato místa nebyla navzájem propojena a obrazec připomínal květ.

Další zvlákňování bylo realizováno s roztoky o koncentracích 10% ve směsi dvou výše uvedených rozpouštědel. Poměry chloroform a aceton byly zvoleny 95:5 a 80:20. První roztok, který byl zvlákňován, byl poměr 95:5 při vzdálenosti 70mm a napětí 22kV. Tento roztok byl prakticky netečný k přivedenému napětí na elektrody,

docházelo pouze k odletům kusu polymeru mimo kolektor. Další roztokem byl poměr 80:20. Zde již bylo testováno startovací napětí pro zvlákňování, to nastalo při 18kV, kdy se vytvořil první kónus a na kondenzoru se tvořila slabá nanovrstva. Při zvýšení napětí na 20 kV zvlákňování probíhalo velice klidně a nedocházelo k odletům polymeru, pouze k tvoření korunky. Výsledná vrstva nebyla pravidelná, ale nehomogenní.



Obr. 6 – Vrstva vytvořená při 22 kV.

Poté byly provedeny pokusy s roztokem PLGA ve směsi chloroform / dichlormethan, které jsou popsány v kapitole 3.3.4.

Po těchto pokusech byly znovu prováděny pokusy se směsí chloroform a aceton. Byl namíchán roztok o koncentraci 10 hmot. % s poměrem rozpouštědel 60:40 (chloroform/aceton). Procesní veličiny zvlákňování byly stanoveny na vzdálenost 100 mm a napětí 20 kV. Zvlákňování z hrotu probíhalo velice klidně a dlouho, do té doby, než se roztok polymeru úplně vyčerpal. Ke konci zvlákňování docházelo k odletům velkých kusů polymeru, což bylo způsobeno odpařením většiny rozpouštědel, a tím k nárůstu viskozity a následným tuhnutím polymeru již na hrotu. Výsledná vrstva byla opět ve tvaru kytice, ale plocha nanovláken byla podstatně větší a došlo také k částečnému propojení těchto vzniklých ploch. Tento poměr rozpouštědel byl velice dobrý, zejména výsledná vrstva byla velice kvalitní. Bylo ale

žádoucí vylepšit samotný proces zvlákňování, zejména zintenzivnit tvoření kuželů na celém povrchu kapky polymerního roztoku.

Následně byla snížena koncentrace roztoku na 8 hmot. %, přičemž byl zachován poměr rozpouštědel, roztok byl tedy namíchán a zvlákňován při vzdálenosti 100 mm a napětí 25 kV. Polymer na povrchu hrotu tvořil velice jemnou korunku, zvlákňoval se velice ochotně a téměř nedocházelo k odletům kusů polymeru. I za dané situace ale stále ještě nedocházelo k tvoření kónusů na celém povrchu kapky polymeru na hrotu. Došlo však ke zvlákňování z více míst a také k vyčerpání celého objemu polymeru z hrotu, což bylo velice pozitivní.

Koncentrace roztoku byla dále snížena až na 6 hmot. % při zachování poměrů rozpouštědel. Tento roztok se choval při zvlákňování velice podobně jako roztok osmiprocentní. Zvlákňování probíhalo velice ochotně a dlouho, docházelo k vyčerpání celého objemu polymeru, ale opět nedocházelo ke zvlákňování z celého povrchu. Později byl namíchán roztok o koncentraci 7 hmot. %. Rozdíly mezi koncentracemi 6%, 7% a 8% a poměrem rozpouštědel 60:40 (chloroform / aceton) byly téměř neznatelné až zanedbatelné. Po tomto pokusu jsem se rozhodl přejít na váleček.

3.4.4 Směs chloroformu a dichlormethanu

Pro pokus byl připraven 10 hmot% roztok PLGA s poměrem rozpouštědel chloroform dichlormethan (30:70). Vzdálenost elektrod byla nastavena na 100 mm a napětí bylo 30 kV. Při tomto poměru rozpouštědel a nastavených parametrech docházelo k velice rychlému a intenzivnímu procesu zvlákňování a odletů kusů polymeru. V důsledku toho bylo tedy sníženo napětí na hodnotu 25 kV. Proces zvlákňování se výrazně utlumil a ke zvlákňování docházelo pouze na zadní části hrotu, z přední části docházelo ke slabým odletům polymeru. Roztok polymeru byl vyměněn, hrot vyčištěn a následně byl aplikován nový polymer stejných vlastností. Po nastavení stejných procesních podmínek na první pohled nedocházelo ke zvlákňování, ale to byl pouze optický klam. Ke zvlákňování polymeru docházelo, ale ve velice malé intenzitě. Výsledná vrstva byla velice tenká a nehomogenní, tedy zcela nevhodná k dalšímu požití.

Do tohoto roztoku bylo přidáno ještě další rozpouštědlo, a to aceton. Polymer byl velice silně viskózní a nedocházelo ke zvlákňování. Možný následek tohoto neúspěchu by mohl být starý polymerní roztok, protože nebyl nově namíchán, ale byl použit zbytek z předchozího pokusu.



Obr. 7 – Výsledná vrstva vytvořená pomocí směsi rozpouštědel chloroform / dichlormethan

3.5 Popis zařízení, na kterém proběhlo zvlákňování

3.5.1 Popis zvlákňovacího zařízení

Zvlákňování bylo prováděno na dvou laboratorních zvlákňovacích zařízeních. První zařízení představoval ocelový hrot ve tvaru válce o průměru 10 mm a výškou 350mm, který byl ukotven v polypropylenové desce. Deska byla umístěna na dřevěných podstavcích, což představovaly dva kvádry zhotovené ze smrkového dřeva.



Obr. 8 – Zvláknovací hrot

Na tento hrot se přivádělo napětí ze zdroje. Rozsah zdroje s označením GLASSMAN high voltage,inc., series ER, se pohyboval v rozmezí od 0 do 50 kV, tento zdroj byl pro svůj rozsah označen jako malý. Nad hrotem byl připevněn kolektor, který představovala ocelová deska. Vzdálenost kolektoru od protielektrody byla nastavitelná. Kolektor byl samozřejmě uzemněn. Kolektor překrývala vrstva netkané textilie označovaná jako spunbond, tato textilie byla použita pro možnost rychlejšího a snadnějšího sejmutí vytvořených vzorků. Celé toto zařízení bylo nainstalováno v digestoři, kde bylo možno odsávat nežádoucí páry z těkavých rozpouštědel.

Další zařízení představoval laboratorní přístroj zvaný Nanospider.



Obr. 9 – Nanospider

Toto zařízení bylo zrealizováno na Katedře netkaných textilií Fakulty textilní. K tomuto zařízení byl připojen zdroj s označením SPELLMAN SL 600, USA o rozsahu 0 až 100 kV, který byl pro svůj rozsah označen jako velký. Ve zvlákňovací komoře byl umístěn kolektor i emitor. V této komoře bylo již možné udržovat konstantní podmínky, jako byla teplota a vlhkost. Jako kolektor sloužila ocelová deska, která byla uzemněna. Emitorem byl váleček, který byl usazen v polypropylenové nádobě. Nádoba byla obdélníkového tvaru s objemem cca. 20 mililitrů.

Váleček byl v tomto zařízení vhodně umístěn, mohl tedy vykonávat rotační pohyb a byl ponořen zhruba z 1/3 do zvlákňovaného polymeru, který se nacházel v nádobě. Popsané zařízení zaručovalo kontinuální nanášení polymeru na váleček v konstantní vrstvě po dobu, než došlo k vyčerpání polymeru z nádoby. Rotační pohyb zajišťoval elektromotor, zde bylo možné regulovat otáčky a také směr otáčení. Váleček byl spojen s elektromotorem, s označením ASTERO A9HR40C, hřídelí, která zajišťovala přenos rotačního pohybu mezi motorem a válečkem. Tato hřídel byla vyrobena z nevodivého materiálu, aby nedošlo k poškození motoru. Na váleček

se přivádělo napětí ze zdroje, které bylo kolem 60 kV. Kolektor chránila a překrývala vrstva netkané textilie spunbond, tato vrstva byla dále odtahována dopravníkem, který tvořil ocelový pás. Tento pás procházel přes tepelnou komoru, kde v některých případech mohlo docházet k fixaci právě vytvořených nanovláken. Rychlost pásového dopravníku byla regulovatelná. Regulace teploty horkovzdušné komory nebyla v experimentu využita.

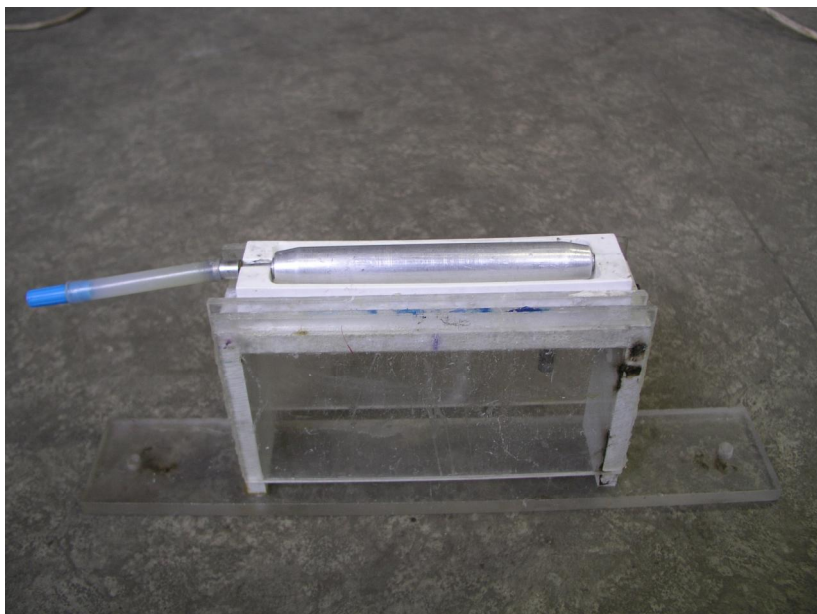
Posledním zařízením bylo zařízení na odsávání nebezpečných látek, tedy výparů, které vznikaly při zvlákňování. Odsávací zařízení s označením FRENIC 5000 G9S bylo připojeno na zvlákňovací box, kde se nacházel kolektor i editor. Tímto zařízením bylo možné regulovat objem odsávaného plynu.

3.5.2 Charakteristika válečků

Zvlákňování polymeru bylo prováděno na čtyřech geometricky rozdílných typech válečků.

Váleček - 1. typ

Tento typ válečku byl označen jako hladký váleček, tedy prostý válec bez výstupků. Zvlákňování bylo prováděno ze vzdálenosti 100 mm při napětí 60 kV. Zvlákňování probíhalo velice neochotně, prakticky vůbec. Místa, kde se tvořily kónusy, byla pouze na okrajích válečku, tedy v místě ostrého přechodu. Z pozorování průběhu procesu bylo odvozeno, že na ostré hraně dochází k hromadění náboje, tudíž i k samotnému zvlákňování.



Obr. 10 – Váleček – 1. typ

Cílem bylo pokusit se změnit geometrii válečku z hladkého povrchu na povrch, kde by mohlo docházet ke koncentraci náboje. Byly tedy prováděny pokusy na válečku 2. typu.

Váleček - 2. typ

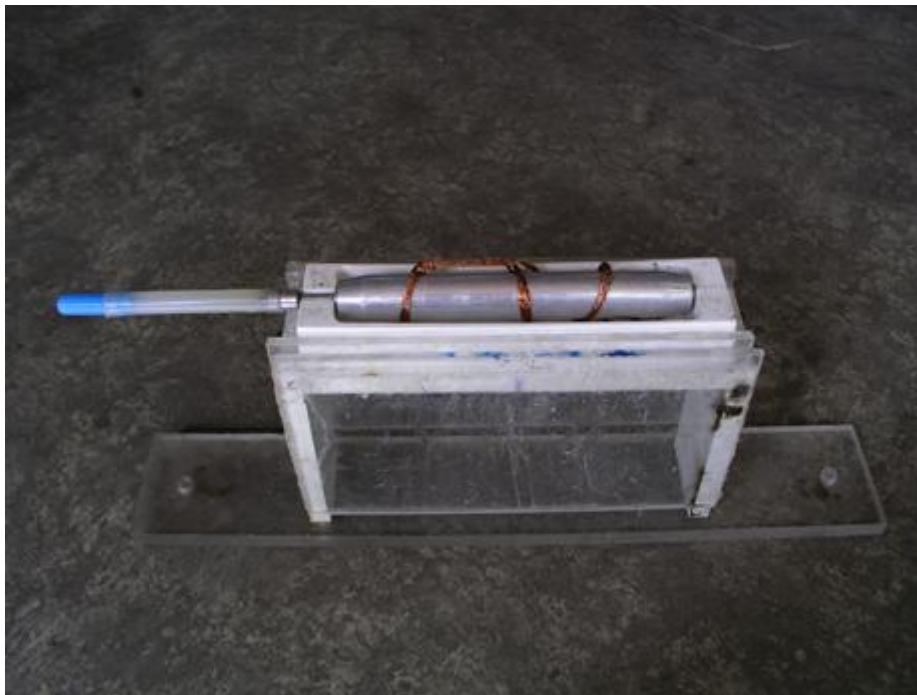
Tento váleček se od předchozího válečku dosti zásadně odlišoval. Na jeho povrchu byl navinut měděný drát do tvaru šroubovice, tento drát byl také k válečku pevně ukotven, aby nedocházelo k prokluzování mezi válečkem a drátem. Podmínky byly voleny stejně jako u předchozího typu, tedy vzdálenost elektrod 100 mm a napětí 60 kV. Zvlákňování téměř neprobíhalo, a to zejména z krajů válečku; kónusy se tvořily pouze na čtyřech krajních závitech z každé strany. To byl již určitý pokrok, neboť se potvrdil předpoklad o koncentraci náboje v určitých místech válečku a k přednostnímu zvlákňování z těchto míst. Výsledná vrstva byla však velice neuspokojivá, tvořily ji jakési pásy nanovláken, které nebyly navzájem spojeny a byly velice nehomogenní. Byla provedena změna geometrii na 3. Typ.



Obr. 11 – Váleček – 2. typ

Váleček - 3.typ

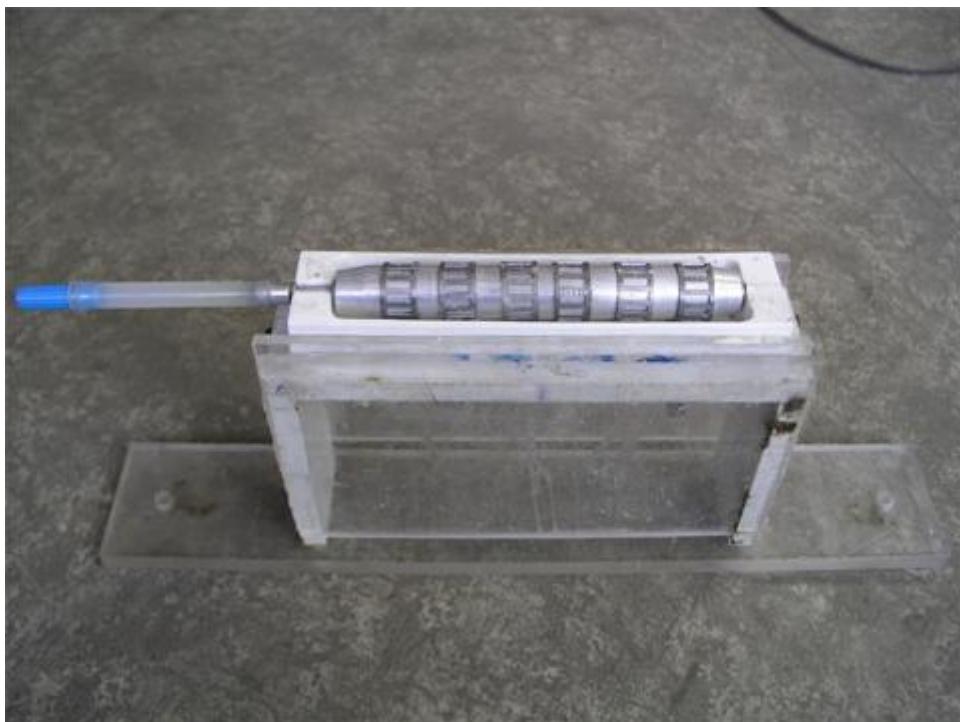
Váleček byl velmi podobný typu 2, jen s rozdílem vinutí drátu. Drát byl navinut zcela nahodile, tak, aby tvořil co nejméně závitů. Další podmínkou bylo, aby drát netvořil pravidelnou šroubovici, ale byl vinut podélně s osou válečku. Parametry zvlákňování byly nastaveny opět stejně jako u předchozích dvou typů. Zvlákňování probíhalo s větší ochotou i intenzitou, a to zejména v místě, kde byl drát veden rovnoběžně s osou válečku, zhruba 1 – 2 mm nad povrchem válečku. Zde se při každém otočení tvořilo nejvíce kuželů a docházelo k nejintenzivnějšímu zvlákňování. Po několika málo minutách došlo k elektrostatickému výboji mezi elektrodami a také k následnému požáru. Tento požár byl způsoben jiskrou a následným vznícením výparů z rozpouštědel. Požár byl uhašen velice rychle, ale přesto došlo k znehodnocení velké části vytvořené nanovlákněné vrstvy a také použitého polymeru. Zde se, tedy objevil další problém, a to vysoká vznětlivost rozpouštědel a výparů při elektrostatickém výboji. Pro další pokusy byl tedy vytvořen poslední typ válečku.



Obr. 12 – Váleček – 3. typ

Váleček - 4.typ

U tohoto typu válečku již nebyl použit měděný drát jako u typů 2 a 3, ale byl vytvořen zcela nový typ. Jako základ byl použit hladký váleček, na který jsem vytvořil sadu šesti objímek, jakýchsi prstýnků. Tyto prstýnky byly vyrobeny z železného pásku. Pásek byl rozdělen na stejně dlouhé úseky a ty byly upraveny tak, aby přesně obepínaly použitý váleček jako objímky. Použitá pásovina měla podobnou strukturu jako žebřík. Zde tedy bylo využito mnoha ostrých přechodů a hran, na kterých docházelo ke zvlákňování.



Obr. 13 – Váleček – 4. typ



Obr. 14 – Použité prstýnky pro váleček – 4. typ

Výhodou takto vytvořených prstýnků byla snadná montáž na váleček, snadná výměna těchto elementů za jiné a v neposlední řadě rychlá modifikace výchozího válečku bez potřeby konstruovat váleček nový. Podmínky byly nastaveny opět stejně jako u předchozích případů. Zvlákňování nastartovalo téměř okamžitě, ale bylo málo

intenzivní, výsledná vrstva byla velice tenká a nedala se z podkladového materiálu sejmut. Zde se tedy objevil další problém. Zvýšení intenzity bylo možné dosáhnout zvýšením napětí nebo snížením vzdálenosti mezi elektrodami. U obou těchto metod ale hrozilo nebezpečí elektrostatického výboje a následného požáru. Výsledkem tedy bylo použití zemního elementu, kterým docházelo k ovlivňování elektrostatického pole a také lokálnímu zvyšování intenzity.

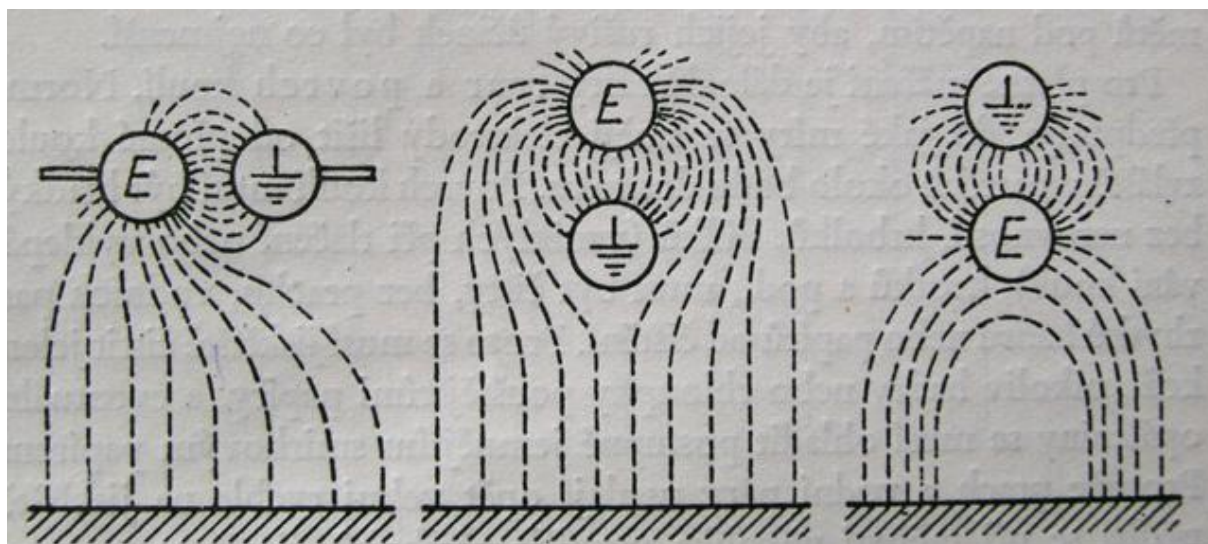
3.6 Modifikace procesu zvlákňování

3.6.1 Úprava vodivosti

Pro zlepšení procesu zvlákňování byly použity látky na úpravu vodivosti polymeru. Jako první byla použita chemická sloučenina tetraethylamoniumbromid, dále jen TEAB. Předpokládalo se, že po aplikaci této látky do zvlákňovaného roztoku se zlepší vodivost, tedy dojde také ke zlepšení samotného procesu zvlákňování. Toto se u TEAB nepotvrdilo. Zvlákňování probíhalo velice podobně i s jodidem draselným (KI) rozpuštěném v roztoku polymeru. Nebyl pozorován žádný pozitivní vliv na proces, proto se od úpravy vodivosti roztoku upustilo.

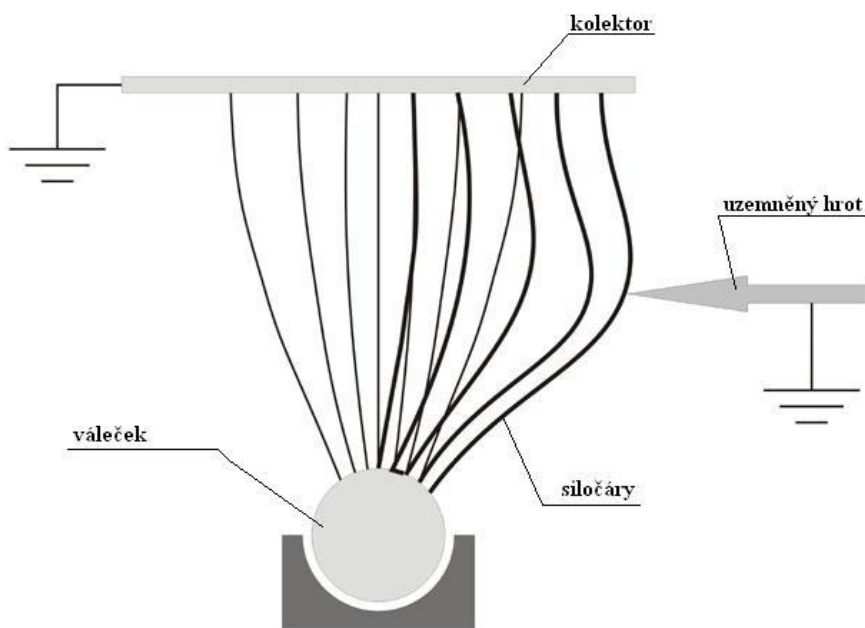
3.6.2 Ovlivnění elektrického pole

Již v minulosti byl prokázán podstatný vliv heterogenních elektrod na proces zvlákňování. Dochází tedy k vyšší koncentraci nanovláken na předem určená místa elektrody specifického tvaru např. plošného spoje. Výsledky jsou shrnuty v semestrální práci „Textilní tkáňové nosiče“ (2006), autorů Silvia Martauzová, Jiří Chvojka pod vedením Prof. David Lukáš. V tomto experimentu byl testován vliv uzemněného hrotu na elektrické pole. Autoři vychází z práce Nováka (1954) [22]. V této publikaci byl popsán vliv deformace elektrického pole po vložení uzemněného hrotu do tohoto pole. Způsoby vložení hrotu jsou uvedeny na obrázku.



Obr. 15 – Deformace elektrického pole po vložení uzemněného hrotu

Tato teorie elektrického pole kulovitěho jiskřiště se potvrdila při zvlákňování PLGA, kdy po vložení uzemněného hrotu mezi dvě elektrody docházelo k rychlejšímu nastartování zvlákňování, a po setrvání také k větší intenzitě. Docházelo k deformaci elektrického pole směrem k uzemněnému hrotu, tedy k lokálnímu nárůstu intenzity mezi hrotem a válečkem. Vytvořená nanovlákná se přednostně orientovala k hrotu, ale časem síla elektrického pole mezi válečkem a kondenzorem převážila a vlákna se začala orientovat ke kondenzoru, kde se také usazovala. Tento vliv vnějšího zásahu byl velice přínosný pro samotný proces zvlákňování a také kvalitu výsledné vrstvy. Toto je schematicky znázorněno na obrázku.



Obr. 16 – Vliv hrotu na deformaci elektrického pole

3.6.3 Hildebrandův parametr

Důležitým faktorem ovlivňující elektrostatické zvlákňování je tzv. parametr rozpustnosti. Označuje se δ a jeho jednotka je $(\text{J/ml})^{1/2}$. V každé kapalině existují soudržné síly, které drží molekuly kapaliny spojeny. Při vypařování dochází k oddělování jednotlivých molekul z povrchových vrstev kapaliny. Energie vypaření 1 molu kapaliny je rovna molárnímu teplu vypařování ΔH^v . Toto může být přibližně nahrazeno vztahem RT , kde R je molární plynová konstanta ($8,3145 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) a T je absolutní teplota v Kelvinech. Pokud tento vztah vydělíme objemem kapaliny, získáme hustotu kohezní energie. Pokud tuto hodnotu umocníme, je tento vztah nazýváno Hildebrandův parametr rozpustnosti.

$$\delta^2 = (\Delta H^v - RT)/V$$

Pro výpočet Hildebrandova parametru (HP) pro jednotlivá rozpouštědla a jejich vzájemné poměry se postupovalo následovně. V chemických tabulkách [23] byla vyhledána hodnota Hildebrandova parametru rozpustnosti pro jednotlivá

rozpouštědla, poté se určil vzájemný poměr obou použitých rozpouštědel a procentuální díl se vynásobil konstantou pro určité rozpouštědlo. Například byla vybrána koncentrace 60:40 chloroform aceton. Byly nalezeny hodnoty pro chloroform $\delta = 19$ a pro aceton $\delta = 20,3$. Poté se provedl výpočet následujícím způsobem.

$$\delta = 0,6 \cdot 19 + 0,4 \cdot 20,3 = 19,52 \text{ (J/ml)}^{1/2}$$

Příklad byl vybrán záměrně, protože poměr rozpouštědel se jevil jako nejlepší pro vytvoření nanovláknenné vrstvy. Později byl parametr počítán pro další rozpouštědla, jejich směsi a vzájemné poměry, k určení dalšího vhodného poměru rozpouštědel. Bylo nutné stanovit vhodný poměr rozpouštědel, který by se svojí hodnotou přibližně rovnal již prověřené koncentraci. V tabulce jsou uvedeny hodnoty pro parametr δ .

rozpouštědlo	δ (J/ml) ^{1/2}
dichlormethan	19,85
chloroform	19
1,2-	
dichlorethane	20,1
voda	48
methanol	29,5
ethanol	26,2
aceton	20,3
ethylacetát	18,6

Tab. 2 – Parametr rozpustnosti, vedeno v [23]

Pomocí tabulek [23] byl stanoven parametr rozpustnosti pro kopolymer PLGA v poměru 50/50 na hodnotu $\delta = 20,44 \text{ (J/ml)}^{1/2}$. Následně byl proveden přepočet pro poměr kopolymeru PLGA 75/25, tato hodnota byla stanovena $\delta = 20,34 \text{ (J/ml)}^{1/2}$. Byl tedy proveden pokus, který měl potvrdit, zda teorie parametru rozpustnosti je pravdivá či není. Dle tabulek bylo vybráno rozpouštědlo, které se svým parametrem rozpustnosti nejvíce blížilo parametru rozpustnosti kopolymeru PLGA 75/25. Tímto

rozpouštědlem byl aceton, jehož parametr byl $\delta = 20,3 \text{ (J/ml)}^{1/2}$. Pokus potvrdil bezezbytku Hildebrantovu teorii a kopolymer PLGA se výborně rozpustil v použitém rozpouštědle. Roztok byl čirý a kopolymer PLGA byl kompletně a beze zbytku rozpuštěn. Parametr rozpustnosti pro směs rozpouštědel chloroform aceton v poměru 60:40 byl $\delta = 19,52 \text{ (J/ml)}^{1/2}$. Tato hodnota se přibližně rovnala parametru rozpustnosti kopolymeru PLGA 75/25, dá se tak předpokládat, že kopolymer PLGA bude snadno a bezezbytku rozpustný v této směsi rozpouštědel.

Další výpočty Hildebrantova parametru pro různé poměry rozpouštědel jsou uvedeny v následující tabulce. Při výpočtu byla porovnávána celková hodnota, která se měla nejvíce blížit hodnotě, kterou udával poměr 60: 40 chloroform aceton. K této hodnotě se nejvíce blížil poměr 40 : 60 chloroform dichlormethan. Dalším poměrem byl 30 : 70 ethylacetát dichlormethan, následoval 30 : 70 chloroform dichlormethan a posledním vybraným poměrem, který se velice přibližoval hodnotě 19,52, byl poměr 20 : 80 ethylacetát dichlormethan. Po tomto výpočtu byly namíchány příslušné roztoky polymerů, ale samotné zvlákňování neprobíhalo žádoucím způsobem. Výpočet tohoto parametru nebyl chybný, ale potvrdila se přítomnost dalších vlivů, které zásadně ovlivňují samotné zvlákňování. Za zásadní vlivy, které ovlivňují proces zvlákňování, lze považovat teplotu okolí a vlhkost. Tyto vlivy je již možné regulovat a přesně nastavovat pomocí nově vytvořené klimatizované komory. V tomto případě nebylo použití klimatizované komory možné, neboť ještě nebyla plně provozu schopná, a poté sama procházela testováním.

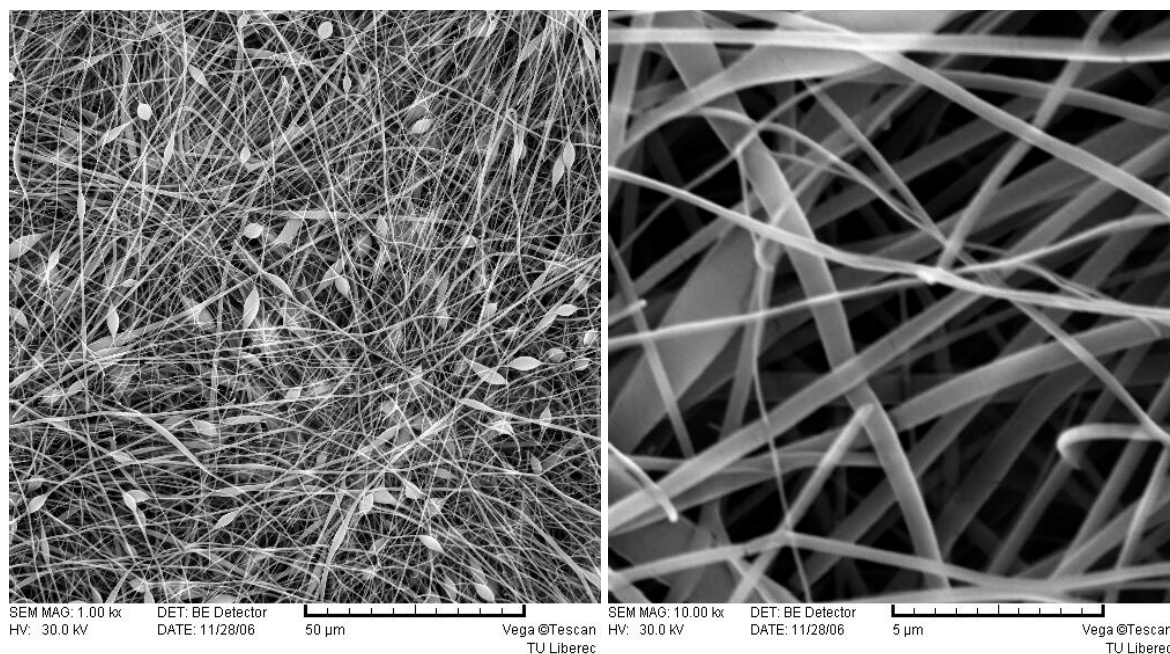
vzájemný poměr	rozpuštědla	δ1		δ2		výsledek
80:20	chloroform : aceton	0,8	19	0,2	20,3	19,26
70:30	chloroform : aceton	0,7	19	0,3	20,3	19,39
60:40	chloroform : aceton	0,6	19	0,4	20,3	19,52
50:50	chloroform : aceton	0,5	19	0,5	20,3	19,65
95:5	dichlormethan : aceton	0,95	19,85	0,05	20,3	19,8725
80:20	dichlormethan : aceton	0,8	19,85	0,2	20,3	19,94
70:30	dichlormethan : aceton	0,7	19,85	0,3	20,3	19,985
60:40	dichlormethan : aceton	0,6	19,85	0,4	20,3	20,03
50:50	dichlormethan : aceton	0,5	19,85	0,5	20,3	20,075
30:70	chlrfom : dichlormethan	0,3	19	0,7	19,85	19,595
40:60	chlrfom : dichlormethan	0,4	19	0,6	19,85	19,51
50:50	chlrfom : dichlormethan	0,5	19	0,5	19,85	19,425
50:50	ethanol : dichlormethan	0,5	26,2	0,5	19,85	23,025
40:60	ethanol : dichlormethan	0,4	26,2	0,6	19,85	22,39
30:70	ethanol : dichlormethan	0,3	26,2	0,7	19,85	21,755
20:80	ethanol : dichlormethan	0,2	26,2	0,8	19,85	21,12
20:80	ethylacetát : dichlormethan	0,2	18,6	0,8	19,85	19,6
60:40	ethylacetát : dichlormethan	0,6	18,6	0,4	19,85	19,1
70:30	ethylacetát : dichlomet	0,7	18,6	0,3	19,85	18,975
40:60	ethylacetát : dichlormethan	0,4	18,6	0,6	19,85	19,35
30:70	ethylacetát : dichlormethan	0,3	18,6	0,7	19,85	19,475
30:70	dichlorethan : chloroform	0,3	19,85	0,7	19	19,255
40:60	dichlorethan : chloroform	0,4	19,85	0,6	19	19,34
50:50	dichlorethan : chloroform	0,5	19,85	0,5	19	19,425
60:40	dichlorethan : chloroform	0,6	19,85	0,4	19	19,51
70:30	dichlorethan : chloroform	0,7	19,85	0,3	19	19,595

Tab. 3 – Výpočet parametru rozpustnosti pro použité směsi rozpouštědel

3.7 Vliv koncentrace rozpouštědel na průměr vláken

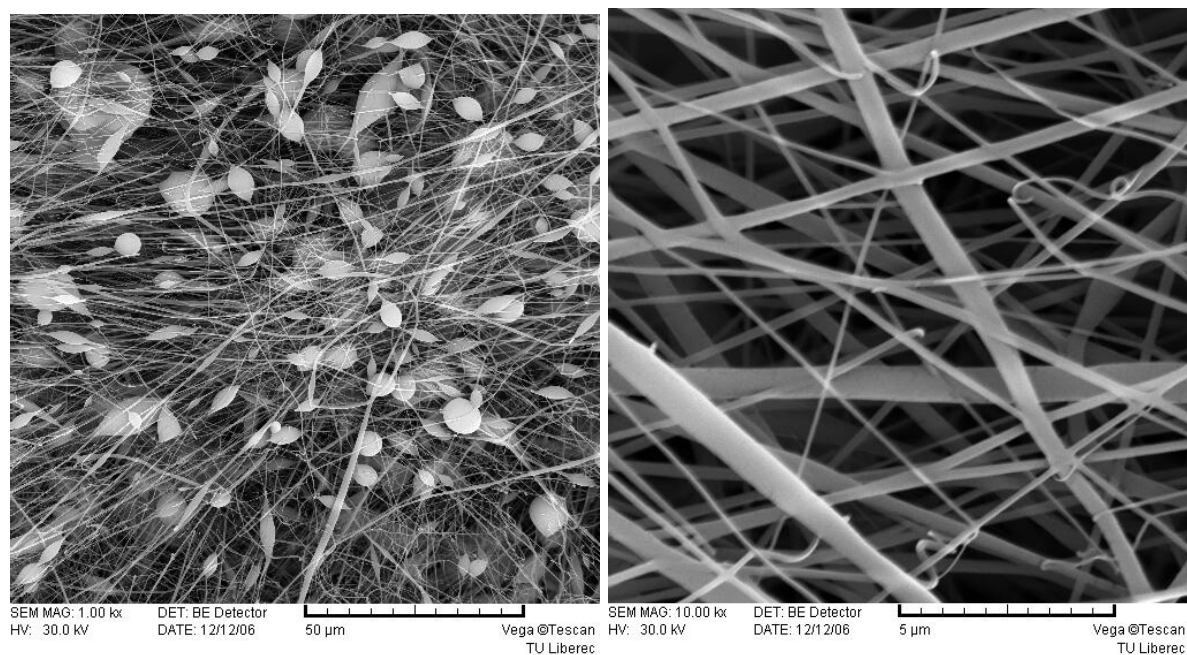
Pro prostudování vlivu koncentrace na průměr vláken byla použita rozpouštědla chloroform aceton o poměru 60 : 40 a koncentrace roztoků se pohybovaly mezi 10 hm% až 6 hm%. Všechny nanovláknenné vrstvy vznikly při zvlákňování z hrotu.

10% PLGA



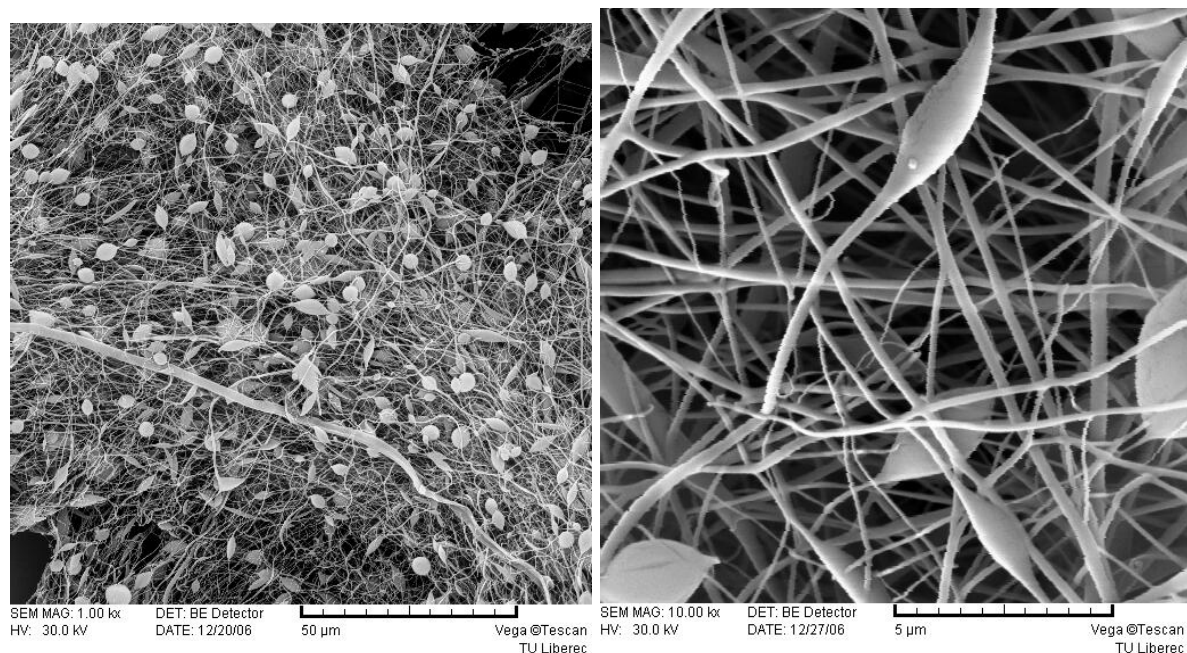
Obr. 17 – Snímek pořízený ze SEM, 10 % PLGA

8% PLGA



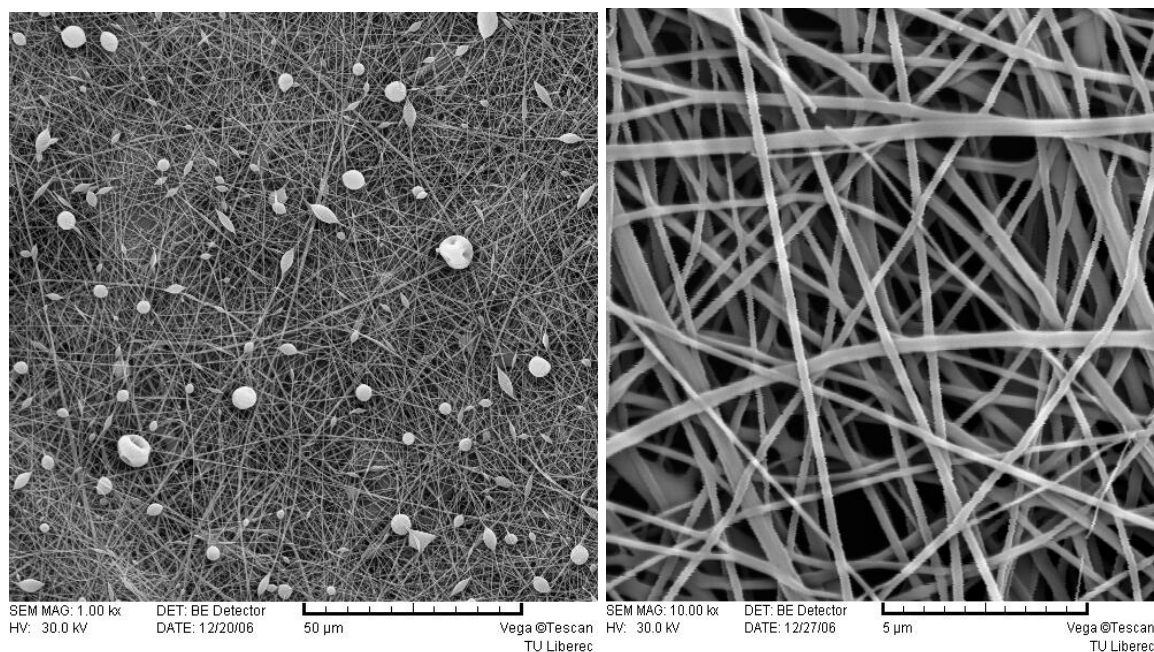
Obr. 18 – Snímek pořízený ze SEM, 8 % PLGA

7% PLGA



Obr. 19 – Snímek pořízený ze SEM, 7 % PLGA

6% PLGA



Obr. 20 – Snímek pořízený ze SEM, 6 % PLGA

Z přiložených SEM snímků je zřejmý velký počet defektů. Tyto defekty vznikají při elektrostatickém zvlákňování. Při přivedení vysokého napětí do roztoku polymeru nedochází ke dloužení vláken elektrostatickou silou mezi elektrodami, ale v samotném vláknu; dochází tak k odpuzování nábojů ve vláknech a tím k dloužení vláken samotných. Vlivem rozpouštědel musí tedy dojít k rozdělení nábojů a k jejich volnému pohybu v roztoku.

Defekt je tedy místo, kde nedošlo k rozdělení náboje, a tedy nemohlo dojít ani k samotnému dloužení. Tyto defekty mají kuličkový tvar a někdy tento tvar může přecházet až do vřetenovitého tvaru. Největší počet defektů se vyskytoval u koncentrace 7 %, poté u koncentrace 8 %. Desetiprocentní koncentrace již vykazovala zhruba poloviční počet defektů. Nejméně defektů vykazovala koncentrace 6 %, kde se vyskytovaly oba typy defektů, vřetenové i kuličkové.

Byl sledován průměr vláken, která vznikla při zvlákňování, a dále to, zda jejich průměr ovlivnila koncentrace. Snímky z SEM byly proměřeny na programu Lucie, proměřoval se průměr vláken. Z měření vyplynulo, že se snižováním koncentrace se snižuje i průměr vláken. Naměřené průměry z padesáti měření jsou uvedeny v tabulce číslo 4.

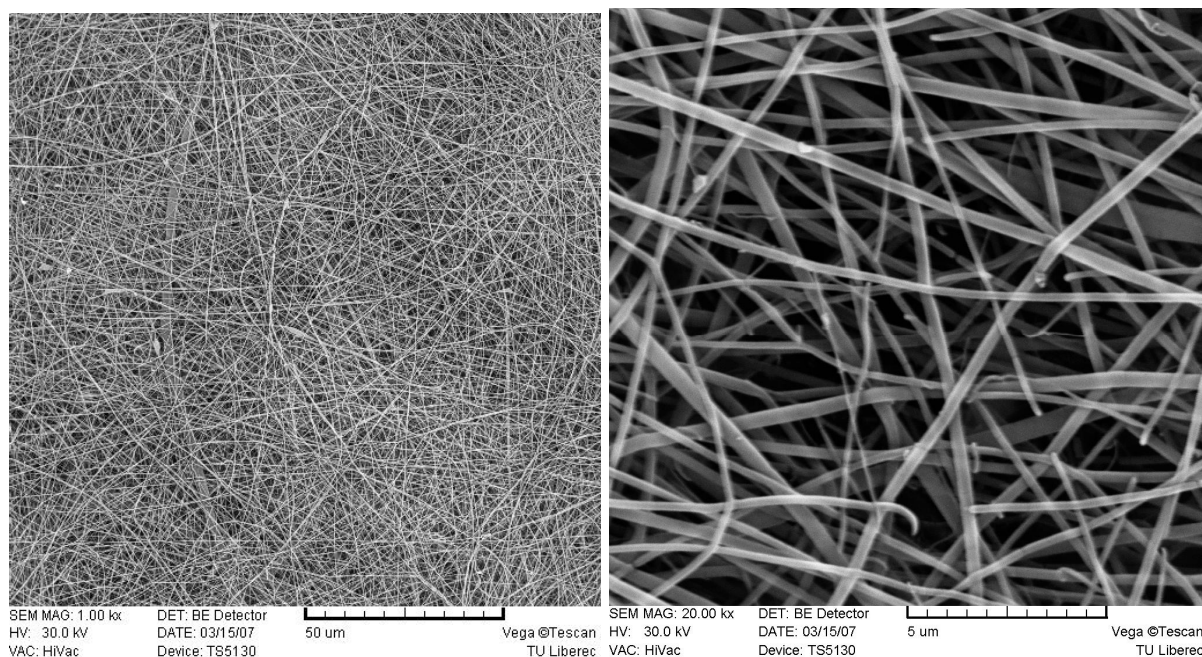
10%	425.90 nm
8%	327.61 nm
7%	215.84 nm
6%	206.69 nm

Tab. 4 – Průměrná tloušťka nanovláken

Dále byl sledován vliv koncentrace na velikost pórů v nanovlákněné vrstvě, toto bylo provedeno pouze vizuálně. Zde se také potvrdilo, že s klesající koncentrací dochází ke zjemnění vláken, a tedy k většímu zaplnění.

3.8 Vliv geometrie válečku na průměr vláken

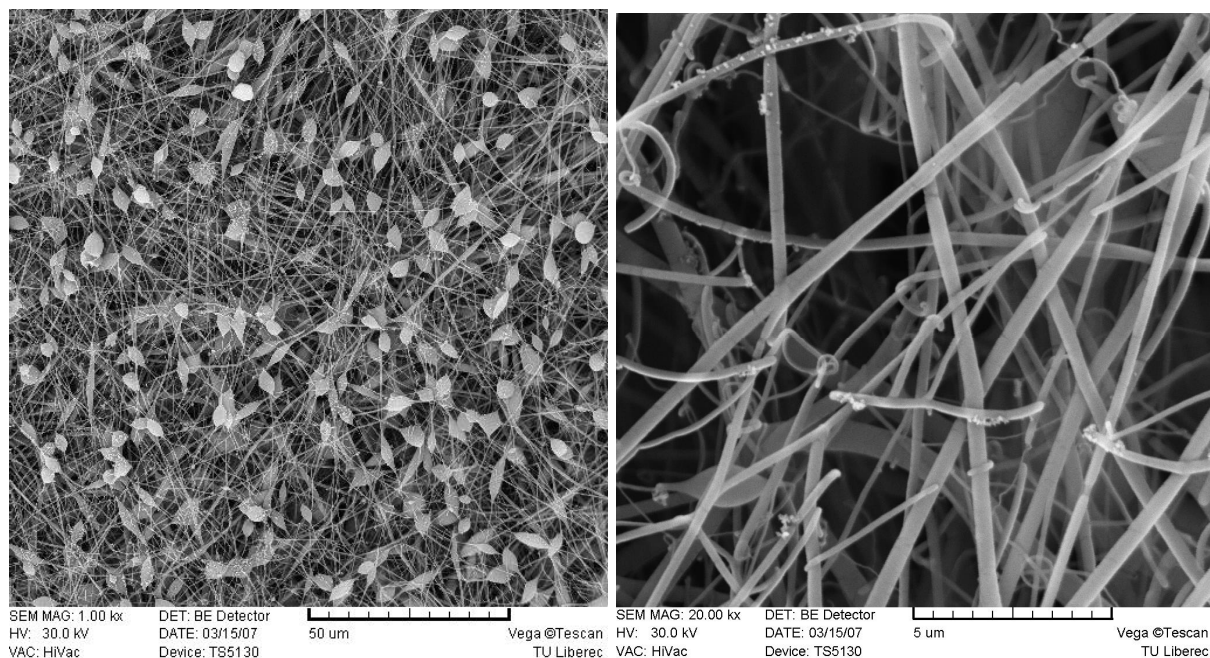
V této části bylo sledováno, zda má geometrie válečku vliv na průměr vláken, kvalitu nanovlákněné vrstvy a zda se budou tvořit defekty. Experiment probíhal s jedinou koncentrací polymerního roztoku, která byla vyhodnocena podle předchozích pokusů jako optimální. Optimální koncentrací je rozuměna 8% PLGA chloroform aceton v poměru 60 : 40. Jako první váleček byl použit váleček hladký bez speciálního povrchu.



Obr. 21 – Snímek pořízený ze SEM, 8% PLGA, vrstva vytvořená na válečku 1. typu

Vlákna vzniklá z tohoto typu válečku jsou velice jemná a neobsahují téměř žádné defekty. Nicméně samotné zvlákňování probíhalo velice neochotně a výsledná vrstva měla velmi neuspokojivé vlastnosti co se týče tloušťky, pokryté plochy a také pevnosti vrstvy. Vzniklá vlákna se také dala jen velice obtížně sejmut z podkladové textilie.

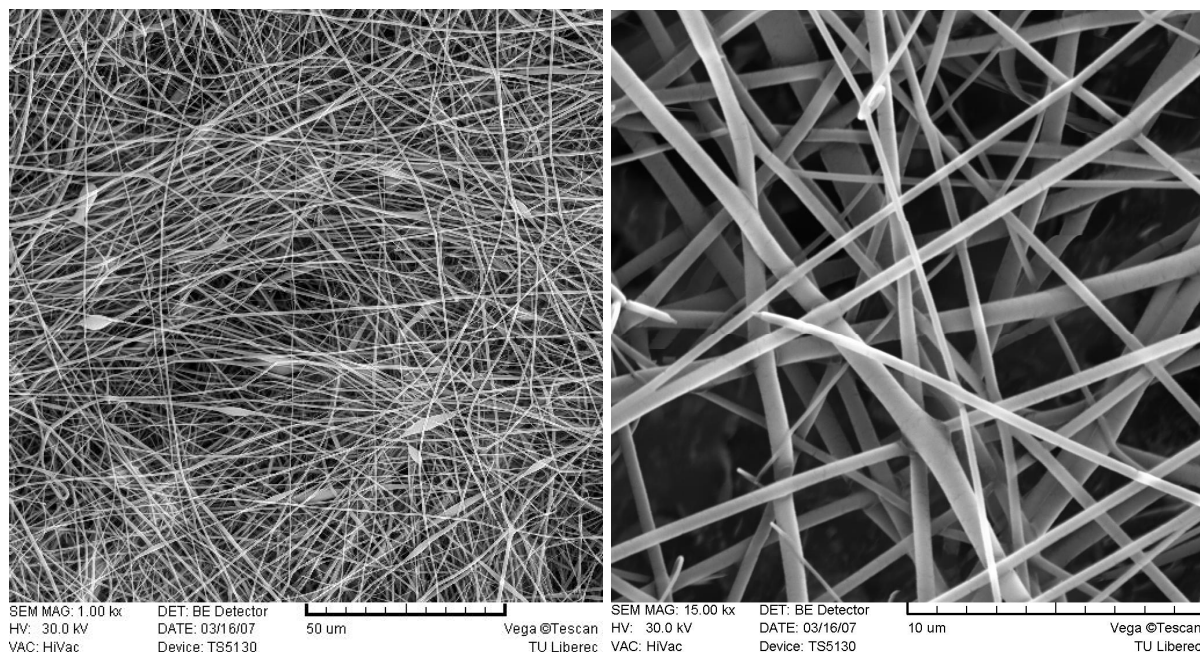
Další snímky jsou z válečku, který byl pracovně označen jako 2. typ. Tento váleček byl popsán v kapitole 3.5.2. Vzniklá vlákna jsou zobrazena na obrázku.



Obr. 22 – Snímek pořízený ze SEM, 8% PLGA, vrstva vytvořená na válečku 2. typu

V tomto případě se formovalo velké množství geometrických defektů. Vlákna na obr. 22 se velice podobají svojí jemností vláknům, která vznikla z prvního válečku (Obr. 21), ale přítomnost defektů byla velmi vysoká. Vrstva měla lepší mechanické vlastnosti, ale přesto nebyla potřebných rozměrů a kvality.

V poslední řadě byl testován vliv geometrie válečku číslo 4. (Obr. 23) Tento váleček měl na svém povrchu speciální objímky, které byly připraveny speciálně pro toto zvlákňování.



Obr. 23 – Snímek pořízený ze SEM, 8% PLGA, vrstva vytvořená na válečku 4. typu

Vlákna vytvořená na tomto typu válečku neobsahovala téměř žádné defekty. Vytvořená vrstva byla velice kvalitní, homogenní, s dostatečnou hustotou vláken. Vzorky pro pozorování a následné snímky byly vybrány velice pečlivě, jejich sejmutí z podkladové textilie bylo velmi snadné. Vytvořená vrstva se při vizuálním hodnocení jevila jako kompaktní. Na snímcích byl pomocí softwaru Lucie změřen průměr vláken. Hodnoty průměrů nanovláken jsou uvedeny v tabulce č. 5.

vál.1	253.66 nm
vál.2	334.76 nm
vál 4	419.53 nm

Tab. 5 – Průměry nanovláken vzniklých z použitých válečků

Z tabulky je zřejmé, že průměr vláken je ovlivněn geometrií válečku. Nejmenší průměry vytvořených vláken byl vytvořen na válečku 1. typu, u válečku 2. typu se průměr vláken zvýšil v průměru zhruba o 100 nm. Vlákna s nejmenšími průměry byla vytvořena na válečku 1. typu, při aplikaci válečku 2. typu vzrostl průměr vláken o zhruba 100 nm. Nejvyšší průměr vláken byl naměřen v nanovláknenné vrstvě vytvořené pomocí válečku 4. typu.

3.9 Tenzometr KRÜSS K12

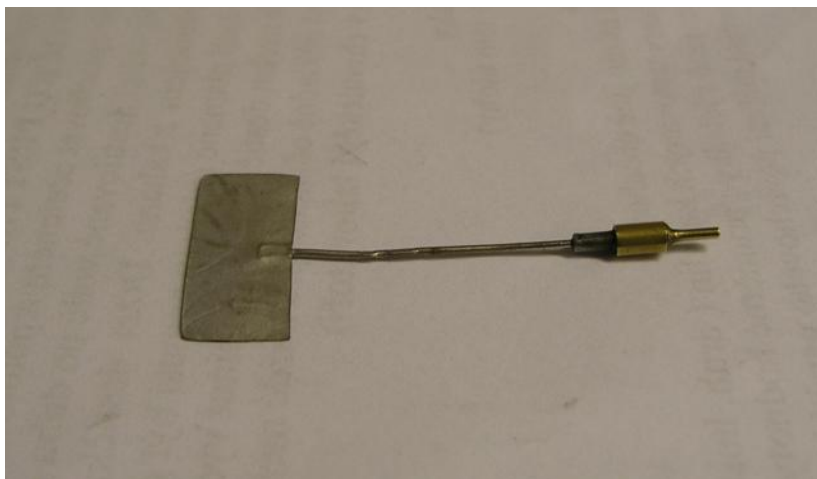
Povrchové napětí výsledného roztoku bylo zjišťováno na tenzometru KRÜSS K12 od firmy KRÜSS GmbH.



Obr. 24 – Tenzometr KRÜSS K 12

Tento přístroj dokáže velice přesně stanovit mezifázové a povrchové napětí kapaliny. Je složen z jednotky pro měření povrchového napětí a stolního počítače, který on-line vyhodnocuje právě měřená data. Pro vyhodnocení naměřených dat byl použit speciální program, který byl instalován přímo v počítači; tento přístroj provedl měření povrchového napětí a určení velikosti kontaktního úhlu mezi kapalinou a destičkou.

Měření povrchového napětí je statická metoda, založená na měření síly potřebné k vyzdvižení destičky, která byla ponořena do měřeného roztoku polymeru. Destička byla vytahována kolmo z kapaliny a síla byla měřena velice přesnými váhami. Destička byla vyrobená z platiny, měla speciální drsný povrch a přesně definované rozměry (šířka 19,9 mm, tloušťka: 0,2 mm).



Obr. 25 – Platinová destička

Povrchové napětí měřené kapaliny $\gamma [N \cdot m^{-1}]$ bylo pak určeno podle následujícího vztahu,

$$g = \frac{F_w}{l_w \cdot \cos q}$$

kde $F_w [N]$ je naměřená Wilhelmyho síla, $l_w [m]$ smočená délka a q je úhel, který svírá tečna smáčecí linie s povrchem destičky. Tento vztah platí pouze pro dokonalé smáčení, tedy pro $q = 0^\circ$, což je u většiny kapalin.

Postup měření

Do suché a čisté skleněné nádoby bylo nalito 10ml testovaného roztoku polymeru. Měřicí platinová destička byla upevněna mezi čelisti váhového systému přístroje a ponořena do měřeného roztoku. Poté bylo nutné odaretovat váhový systém tenzometru a nastavit termostat do polohy, aby hladina měřené kapaliny byla rovnoběžná s okrajem destičky a vzdálenost mezi nimi byla asi 2 mm. Vše bylo připraveno pro měření a následovalo tedy spuštění měření v pracovním programu tenzometru. Na obrazovce byl znázorněn graf závislosti povrchového napětí na čase a hodnoty povrchového napětí. Po měření následovalo důkladné očištění platinové destičky a nádoby, kde byl umístěn měřený roztok, aby nedocházelo ke zkreslení hodnot. Platinová destička a nádoba byly nejprve opláchnuty vodou a destilovanou vodou a nakonec byly vyžihány nad plamenem.

V tomto případě byl na přístroji KRÜSS K12 proměřen pouze výsledný roztok o koncentraci 8 hmot.% PLGA s rozpouštědly chloroform / aceton v poměru 60 : 40. Toto složení roztoku dávalo nejlepší předpoklady pro elektrostatické zvlákňování. Výsledná hodnota povrchového napětí pro 8 hmot.% roztok byla 25,67 [mN/m].

4. Závěr

Cílem této práce bylo najít vhodná rozpouštědla, která budou vhodná pro kopolymer PLGA, dále bylo nutné stanovit poměr těchto rozpouštědel a určit vhodnou koncentraci roztoku pro vytvoření nanovlákněné vrstvy. Poměr rozpouštědel byl velice důležitý pro samotný proces elektrostatického zvlákňování a vytvoření plnohodnotné vrstvy, která bude vhodná pro kultivaci buněk na takto vytvořené vrstvě. Koncentrace roztoku byla tedy stanovena na 8 hm. % s rozpouštědly chloroform/aceton v poměru 60:40.

Z tohoto roztoku byla také vytvořena požadovaná nanovlákněná vrstva o rozměrech 70 cm na 20 cm, tato vrstva byla velice kvalitní a tedy vhodná pro další kultivaci buněk. Část takto vytvořené vrstvy nanovláken byla předána na ústav neurověd 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, kde se provádějí pokusy s růstem buněk na nanovlákněných vrstvách. Další část vzorků byla poslána na Fyziologický ústav AV ČR k dalšímu testování. Vrstva, která byla vytvořena z kopolymeru 75/25 PLGA (75%PLA ku 25%PGA) neměla optimální dobu (rychlost) degradace a vysoký poměr kyseliny polymléčné měl za následek značnou křehkost vytvořené vrstvy. Bylo tedy nutné změnit poměr těchto dvou kyselin a to směrem ke zvýšení poměru kyseliny polyglykolové, tento poměr byl tedy změněn na 65:35 v kopolymeru PLGA. Tento typ polymeru vykazoval rozdílné chování při styku s rozpouštědly oproti původnímu polymeru, nedocházelo k úplnému rozpuštění celého objemu polymeru a roztok nebyl čirý. Zvlákňování kopolymeru PLGA s poměrem 65/35 bylo však časově nad rámec této diplomové práce.

Kopolymer PLGA v poměru 75:25 je biokompatibilní a biodegradabilní kopolymer vhodný pro široké použití v medicíně, ale pro svou křehkost není zcela optimální, proto bych doporučil při dalších experimentech pracovat s kopolymerem PLGA v poměru 65:35, který bude mít širší uplatnění při konstrukci scaffoldů pro svoje lepší mechanické vlastnosti, zejména nižší křehkost. Při tvorbě nanovlákněných vrstev projevoval značný vliv geometrie válečku na výslednou kvalitu nanovlákněné vrstvy. Proto bych doporučoval detailně prošetřit vliv geometrie válečku na průměry vláken, velikosti mezivlákněných pórů a vliv geometrie válečku na samotné elektrostatické zvlákňování.

5. Použité materiály

- [1] RŮŽIČKOVÁ, J.: Elektrostatické zvlákňování nanovláken, Technická univerzita v Liberci, Liberec 2004
- [2] FORMHALS, A.: US patent 2,160,962, 1939.
- [3] FORMHALS, A.: US patent, 2,187,306, 1940.
- [4] FORMHALS, A.: US patent, 2,323,025, 1943.
- [5] TU v Liberci: Způsob výroby nanovláken z polymerního roztoku elektrostatickým zvlákňováním a zařízení k provádění způsobu, CZ Patent 294274, 2003-2421.
Dostupné na World Wide Web:
<http://isdvapl.upv.cz/pls/portal30/pt.ptdet?xprim=464826&lan=cs>
- [6] JIRSÁK, O., KALINOVÁ, K.: Netkané textilie, Technická univerzita v Liberci, Liberec 2003
- [7] DEITZEL, J., KLEINMEYER, M., HIRVONEN, J., BECK, K.: Controlled deposition of elektrospun poly(ethylene oxide) fibers. Polymer 42 (2001), p. 8163-8170
- [8] LUKÁŠOVÁ, I.: Taylor, prezentace, dostupné na World Wide Web:
http://www.ft.vslib.cz/depart/knt/nove/index.php?obsah=studium/stranky_predm_etu/mit
<http://isdvapl.upv.cz/pls/portal30/pt.ptdet?xprim=464826&lan=cs>
- [9] Middleton, J. C. and Arthur, T.: Synthetic Biodegradable Polymers as Medical Devices [online] [cit. 15.12. 2005].
Dostupný z WWW: <<http://www.devicelink.com/mpb/archive/98/03/002.html>>
- [10] Wnek, G. E., Bowlin, G. L.: Encyklopedia of: Biomaterials and Biomedical Engineering.
- [11] Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., Biron, R. J., Eagles, D. B., Langer, R. and col.: Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering, BIO/TECHNOLOGY, Vol. 12 July, pages 689- 693, 1994.
- [12] http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/roztoky_makromolekul.html
- [13] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Chloroform>
- [14] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Aceton>
- [15] <http://www.irz.cz/repository/latky/dichlorethan.pdf>

- [16] http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TWW-4F29HNN-1&_user=640831&_coverDate=03%2F01%2F2005&_alid=546357051&_rdoc=4&_fmt=full&_orig=search&_cdi=5573&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_ct=25&_acct=C000034259&_version=1&_urlVersion=0&_userid=640831&md5=b5a375c18a6b99b8946988f54c2210cf
- [17] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Chloroform>
- [18] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Aceton>
- [19] <http://www.irz.cz/repository/latky/dichlorethan.pdf>
- [20] <http://www.irz.cz/latky/dichlormethan>
- [21] <http://www.synthesia.cz/cs/produkty/podle-sbu/nitroceluloza/rozpoustedla-vytlacovane-desky/rozpoustedla/1778-ethylacetat-ethyl-acetat.html>
- [22] Novák, B.: Technika měření systematického napětí, Praha 1954, SNTech Literatury.
- [23] Vohlídal, J., Julák, A., Štulík, K.: Chemicko analytické tabulky, Praha 1999, Grada publisher